

**Expression von TNF-Rezeptoren und TNF- $\alpha$  in Spinalganglien der Ratte  
und deren Änderung im Verlauf der experimentellen Antigen-induzierten  
Arthritis**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Diplombiologin Susanne Hensellek  
geboren am 20.07.1975 in Erfurt

1. Gutachter: Prof. Dr. Claus Liebmann

Friedrich-Schiller Universität Jena, Institut für Biochemie und Biophysik

2. Gutachter: PD Dr. Gisela Segond von Banchet

Universitätsklinikum an der FSU Jena, Institut für Physiologie I

3. Gutachter: Prof. Dr. Wilfrid Jänig

Christian-Albrechts-Universität Kiel, Institut für Physiologie

Tag der öffentlichen Verteidigung: 22.02.2010

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	IV
<b>Zusammenfassung</b>	1
<b>Summary</b>	3
<b>1. Einleitung</b>	5
1.1. Nozizeption und Schmerz	5
1.1.1. Der Schmerz und seine Bedeutung	5
1.1.2. Allgemeine Reizaufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung	5
1.1.3. Erregungsübertragung	6
1.1.4. Reizaufnahme an der Nozizeptorendigung	7
1.1.5. Mechanismen der peripheren und zentralen Sensibilisierung	9
1.2. Die Rheumatoide Arthritis	10
1.3. Antigen-induzierte Arthritis in der Ratte als Modell für die rheumatoide Arthritis im Menschen	12
1.4. Zytokine	12
1.5. Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$	13
1.6. Signaltransduktionswege der TNFR1- und TNFR2-Rezeptoren	14
1.7. IL-1 $\beta$ und die IL1-Rezeptoren	16
1.8. TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ und das nozizeptive System	18
1.9. Zielstellung der Arbeit	20
<b>2. Material und Methoden</b>	22
2.1. Materialien	22
2.1.1. Chemikalien und Laborbedarf	22
2.1.2. Geräte	23
2.1.3. Computerprogramme, Internetprogramme und Internetseiten	24
2.1.4. Antikörper	24
2.1.5. Oligonukleotide	25
2.1.6. Medien	25
2.1.7. Versuchstiere	26
2.2. Immunhistochemische Methoden	26
2.2.1. Auslösung einer Antigen-induzierten Arthritis für real-time PCR-Experimente und histochemische Markierungen	26
2.2.2. Präparation von Lewisratten für die Entnahme der lumbalen Ganglien L1-L5	27
2.2.3. Präparation von Wistarratten und CB57BL/6-Mäuse für die Entnahme von Spinalganglien	27
2.2.4. Herstellung von Paraffinschnitten aus Spinalganglien der Ratte und der Maus	28
2.2.5. TNFR1 Rezeptormarkierung und IB4-Markierung in Spinalganglienschnitten der Wistarratte	28
2.2.6. Auswertung der TNFR1/IB4-Doppelmarkierung	29
2.2.7. TNFR1 und TRPV1 Rezeptor-Doppelmarkierung in Spinalganglienschnitten der Wistarratte	30

2.2.8.	Auswertung der TNFR1/TRPV1-Doppelmarkierung	31
2.2.9.	TNFR1- und TNFR2-Rezeptormarkierung an Schnitten von Spinalganglien nach AIA in Lewisratten und CB57BL/6-Mäusen	32
2.2.10.	Auswertung markierter TNFR1- oder TNFR2-Neurone von Spinalganglien der AIA-Studie und CB57BL/6-Mäusen	33
2.2.11.	TNF- $\alpha$ -Markierung an Schnitten von Spinalganglien nach AIA in Lewisratten	33
2.2.12.	Auswertung markierter TNF- $\alpha$ -Neurone von Spinalganglien der AIA-Studie	34
2.3.	Molekularbiologische Methoden	34
2.3.1.	Gewinnung von Gesamt-RNA	34
	1. RNA-Extraktion aus der Rattenleber	34
	2. RNA-Extraktion aus Spinalganglien von Ratten	35
2.3.2.	Bestimmung der Quantität und Qualität der Gesamt-RNA	35
	1. Quantitative RNA-Bestimmung	35
	2. RNA-Qualitätsbestimmung	36
2.3.3.	Gelelektrophorese	36
	1. Agarose-Gele für DNA	36
	2. Denaturierendes Agarosegel für die RNA-Auftrennung	36
2.3.4.	<i>Reverse Transkriptase</i> -PCR	37
2.3.5.	<i>Real-time</i> PCR-Experimente	37
2.3.6.	Berechnung der Expressionsänderung und Normalisierung der <i>real-time</i> PCR	39
2.3.7.	Bestimmung der PCR-Effizienz	40
2.3.8.	Berechnung des Normalisierungsfaktors	42
2.4.	Verhaltensexperimente	43
2.4.1.	Fortbewegungsverhalten der Versuchstiere	43
2.4.2.	Bestimmung der Gewichtsverteilung zwischen der Hinterbeinen	43
2.4.3.	Kniegelenkschwellung	44
2.4.4.	Testung der Entwicklung einer sekundären Hyperalgesie	44
	1. Sekundäre mechanische Hyperalgesie	44
	2. Sekundäre thermischen Hyperalgesie	45
2.5.	Statistische Auswertungen	45
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	46
3.1.	Immunhistochemische Markierungen an Spinalganglien der Ratte	46
3.1.1.	Darstellung von TNF-Rezeptoren in Spinalganglienschnitten der Ratte	46
3.1.2.	Charakterisierung von TNFR1-positiven Spinalganglien-neuronen	49
3.1.3.	TNF-Rezeptorproteinexpression im Verlauf einer Antigen-induzierten Arthritis	51
3.1.4.	Darstellung von TNF- $\alpha$ in Spinalganglienschnitten	52
3.2.	mRNA-Expression von Zytokinrezeptoren und Zytokinen	54
3.2.1.	mRNA-Expression von TNF-Rezeptoren und TNF- $\alpha$	54
3.2.2.	mRNA-Expression von IL1-Rezeptor 1 und IL1- $\beta$	56
3.3.	Verhaltensversuche an Versuchstieren vor und während einer AIA	58

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	62
4.1.	Die TNF-Rezeptoren sind in Neuronen von Spinalganglienschnitten nachweisbar und TNFR1 ist co-lokalisiert mit TRPV1	63
4.2.	Die TNF- $\alpha$ -Proteinexpression in den Neuronen erhöht sich an Tag 1 und Tag 3, die mRNA-Expression steigt ipsilateral kurzfristig nach 6-8 h während der AIA an	64
4.3.	Die TNF-Rezeptorproteinexpression ändert sich während der AIA nicht, die mRNA-Expression dagegen zeigt Veränderungen im ipsilateralen Spinalganglion	68
4.4.	Die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression sinkt ipsilateral stark ab und steigt kontinuierlich kontralateral an, während die IL1-R1-Expression sich nicht in der AIA ändert	70
4.5.	Schlussfolgerung und Ausblick	72
<b>5.</b>	<b>Literatur</b>	73
<b>6.</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen</b>	80

## Abkürzungsverzeichnis

AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-Propionsäure
AS	Aminosäure
ASIC	<i>Acid sensing ion channel</i>
ATF-3	<i>Activating transcription factor-3</i>
bp	Basenpaare
bio	biotinyliert
CCI	<i>Chronic constriction injury</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CGRP	<i>Calcitonin-Gene-Related-Peptide</i>
CFA	<i>Complete Freund's adjuvant</i>
Ct	<i>Threshold cycle</i>
Cy	Carbocyanin
DD	<i>Death domain</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DRG	<i>dorsal root ganglia</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular signal regulated protein kinase</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GAM	<i>Goat anti-mouse</i>
GAR	<i>Goat anti-rabbit</i>
HLA	humane Leukozytenantigen
IB4	Isolectin B4
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of NF<math>\kappa</math>B</i>
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL1-Ra	IL1-Rezeptor Antagonist
IL1-R1/2	Interleukin1-Rezeptor 1/ 2
IR	<i>Immunoreaktivität</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>

kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen activated protein Kinase</i>
m-BSA	Methyliertes Kälberserumalbumin
MEKK	MAPK/ERK-Kinase-Kinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MOPS	3-[N-Morpholino] Propansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NF	Normalisierungsfaktor
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NMDA	N-Methyl-d-Aspartat
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS 0,3% TX-100	0,3% Triton X-100 in PBS
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RA	rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RIP	<i>Receptor-interacting kinase</i>
RT	Raumtemperatur
SNL	<i>Spinal nerve ligation</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TNFR1/ R2	<i>Tumor necrosis factor receptor 1/ 2</i>
TRADD	<i>TNFR-associated death domain</i>
TRAF	<i>TNF-receptor associated factor</i>
TRPV1	<i>Transient receptor potential vanilloid 1</i>
TTX-R/ S	Tetrodotoxin-resistent/ sensitiv
U	<i>Units</i>
Ubc	Ubiquitin c

## **Zusammenfassung**

Die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  haben bei der Entstehung chronisch entzündlicher Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis eine große Bedeutung. Viele Studien dokumentieren ihre zentrale Rolle bei der Entzündungsentwicklung. Neuere Untersuchungen legen nahe, dass sie zur Schmerzentstehung beitragen können. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass TNF- $\alpha$  auf Neurone der Spinalganglien einwirken kann. Beide TNF-Rezeptoren wurden in Neuronen von Spinalganglien nachgewiesen. An Paraffinschnitten lumbaler Spinalganglien (L1-L5) von Lewisratten wurden Antikörpermarkierungen durchgeführt. Es waren ca. 60% aller Neurone TNFR1- als auch TNFR2-positiv, wobei ca. 60% der kleinen bis mittelgroßen (bis 1000  $\mu\text{m}^2$ ) Neurone TNF-Rezeptor positiv waren. Die Rezeptorproteine TNFR1 und TNFR2 sind demnach in C- und A $\delta$ -Neuronen exprimiert. Eine Expression in nicht-neuronalen Zellen wurde nicht gefunden. Um die TNFR1-positive Neuronengruppe zu charakterisieren und deren Bedeutung im peripheren Nervensystem einzuordnen, wurden TNFR1/TRPV1- und TNFR1/IB4-Doppelmarkierungen an Spinalganglienschnitten von Wistarratten durchgeführt. Der TRPV1-Rezeptor spielt eine wesentliche Rolle bei der Aufnahme von noxischen Hitzereizen. Ungefähr 45% der Neurone waren TNFR1-positiv, 40% der Neurone TRPV1-positiv und 42% der Neurone waren IB4-positiv. Ca. 70% der TNFR1-positiven Zellen waren auch TRPV1-positiv, dagegen waren aber nur 17% der TNFR1-positiven Neurone auch IB4-positiv. Da die meisten Neurone mit TRPV1-Rezeptoren die neuropeptide Substanz P und CGRP synthetisieren, kann der Schluss gezogen werden, dass TNFR1 vorwiegend in der peptidergen Neuronengruppe, d.h. IB4-negativen Neuronen, exprimiert wird.

Erstmals wurde die Lokalisation der TNF-Rezeptoren an lumbalen Spinalganglienneuronen auch im Verlauf einer experimentellen Monoarthritis, der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) untersucht. Während der AIA in Lewisratten an Tag 1, 3, 7 und 21 änderte sich weder ipsilateral noch kontralateral die Anzahl der Neurone, die TNFR1- und TNFR2-Rezeptoren exprimierten (TNFR1 ca. 35-45% und TNFR2 ca. 55-65%). Auffällig war, dass durch die Immunisierung ohne Auslösung einer Arthritis ca. 15% weniger TNFR1-positiv Neurone im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren gezählt wurden. Das weist darauf hin, dass eine systemische Aktivierung des Immunsystems einen Einfluss auf die Expression von neuronalen TNF-Rezeptoren hat. Ergänzende *real-time* PCR-Experimente zeigten das gleiche Ergebnis, außer dass auf der ipsilateralen Seite in der akuten Phase der AIA die Messenger-RNA-Expression (mRNA) für TNFR1 und TNFR2 signifikant abnahm. Bei einer weiteren Studie



am Institut wurde festgestellt, dass durch die AIA keine Nervenschädigung und somit auch kein Absterben der Neurone in Spinalganglien verursacht wurden. Dies unterscheidet die AIA von allen anderen Arthritis- und von Ligationsmodellen. Ein rein entzündlicher Prozess führt demnach nicht zu einer Hochregulation von TNF-Rezeptoren.

Außerdem wurde die Protein- und mRNA-Expression des Zytokins TNF- $\alpha$  in den Spinalganglien während einer AIA untersucht. Nach Antikörpermarkierungen wurden an gesunden unbehandelten Kontrolltieren keine, an immunisierten Tieren vereinzelte und während der AIA ipsilateral an Tag 1 und 3 sowie kontralateral an Tag 3 ca. 14-16% TNF- $\alpha$ -positive Neurone gezählt. Eine Markierung nicht-neuronaler Zellen konnte nicht festgestellt werden, obwohl aktivierte Makrophagen und Monocyten in lumbale Spinalganglien einwanderten. Zusätzlich bewirkte die AIA ipsilateral nach 6-8 h eine 14-fache Zunahme und kontralateral an Tag 21 eine 13-fache Zunahme der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Neurone der Spinalganglien selbst an der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine beteiligt sind und somit „aktiv“ entzündliche und auch nozizeptive Prozesse beeinflussen können.

Des Weiteren wurde die mRNA-Expressionsänderung des IL1-Rezeptor 1 (IL1-R1) und von IL-1 $\beta$  in lumbalen Spinalganglien durch *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (*real-time* PCR) während der AIA nach 6-8 h, Tag 1, 3 und 21 untersucht. Die mRNA-Expression von IL1-R1 zeigte beidseitig keine Veränderung. Die IL-1 $\beta$  mRNA-Expression hingegen sank ipsilateral in der akuten Phase der AIA (Tag 1 und 3) 8-fach ab und stieg kontralateral kontinuierlich auf das 4-fache der Grundexpression am Tag 21 an. Es darf deshalb spekuliert werden, dass IL-1 $\beta$  bei der Entstehung bilateraler Schmerz- und Entzündungsprozesse eine Rolle spielt.

Zusätzlich zur mRNA-Expressions wurde an den Versuchstieren unmittelbar vor dem Töten der Tiere an den jeweiligen Versuchstagen das nozizeptive Verhalten untersucht. Gleichzeitig mit der erhöhten TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression sowie der TNF- $\alpha$ -Proteinexpression in der akuten Phase der Arthritis zeigten die Tiere im Laufverhalten eine Schonhaltung, eine Körpergewichtsverlagerung auf das gesunde Bein und eine Zunahme des Durchmessers des entzündeten ipsilateralen Knies. An der ipsilateralen Pfote nahmen die mechanische sowie die thermische Wegziehschwelle in der akuten Phase der AIA ab. Es besteht demnach eine Korrelation zwischen dem Auftreten von TNF- $\alpha$  und dem Schmerzverhalten der Ratten.

## **Summary**

The pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are important for the development of inflammatory diseases like rheumatoid arthritis. Many studies document the central role of these cytokines for the development of inflammation. More recent research suggests that they also contribute to the generation of pain. The present work shows, that TNF- $\alpha$  can act on neurones of the dorsal root ganglia (DRG). Both TNF-receptors are localized in the neurones of DRGs. In paraffin embedded sections antibody labelling was made on lumbar DRGs from Lewis rats (L1-L5). About 60% of all neurones showed TNFR1- and TNFR2-like immunoreactivity (IR), and 60% of the small-to medium-sized (up to 1000  $\mu\text{m}^2$ ) neurones were TNF-receptor-positive neurone. The receptor proteins TNFR1 and TNFR2 are therefore expressed predominantly in C and A $\delta$  neurones. No expression was found in non-neuronal cells. In order to identify the neurones with TNFR1-like IR (immunoreactivity), the neurones of DRG section from Wistar rats were further characterized with double-labelling experiments for TRPV1 and IB4. The TRPV1-receptor is important for the transduction of noxious heat. About 45% neurones showed TNFR1-like IR, 40% TRPV1-like IR and 42% neurones were IB4-positive. 70% of neurones with TNFR1-like IR were also positive for TRPV1-like IR but only 17% of TNFR1-positive neurones were IB4-positive. Because most neurones with TRPV1-like IR produce substance P and CGRP we conclude, that TNFR1-like IR is expressed predominantly in peptidergic neurones (IB4-negative neurones).

For the first time we investigate the localisation of TNF-receptors in lumbar DRG neurones during the development of antigen-induced arthritis (AIA), an experimentally induced monoarthritis. During the AIA in Lewis rats on days 1, 3, 7 and 21 the proportion of neurones with TNFR1- and TNFR2-like IR changed neither ipsilaterally nor contralaterally (TNFR1-like IR ca.35-45%, TNFR2-like IR ca.55-65%). Because after immunisation alone we found ca. 15% less neurones with TNFR1-like IR compared to the untreated control animals, this could be a hint that the systemic activation of the immune system may influence the expression of neuronal TNF-receptors. Supplementing real-time PCR experiments showed the same results, except that in the acute phase of AIA the mRNA-expression of TNFR1 and TNFR2 decreased significantly in the ipsilateral DRG. A further study at the institute revealed that AIA did not cause neuronal damage or neuronal cell death in the DRGs. Thus AIA differs from other models of arthritis and nerve ligation models. A purely inflammatory process therefore does not cause up regulation of TNF-receptors in neurones.

In addition, the protein and mRNA-expression of the cytokine TNF- $\delta$  was examined in the DRGs during a developing AIA. Untreated control rats showed no positive neurones but after immunisation few neurones with TNF- $\delta$ -like IR were seen. About 14-16% of neurones were TNF- $\delta$ -positive on the ipsilateral side on days 1 and 3 and on the contralateral side on day 3 of AIA. On day 21 only few neurones were labelled. No labelling of non-neuronal cells was seen, although activated macrophages and monocytes migrated into the lumbar DRGs. Additionally, AIA after 6-8 h caused ipsilaterally a 14-fold increase and contralaterally on day 21 a 13-fold increase of the TNF- $\delta$  mRNA-expression. The results suggest that the neurones of the DRGs themselves are involved in the production of pro-inflammatory cytokines and thus „actively“ influence in inflammatory and also nociceptive processes.

Moreover the change of mRNA-expression of the IL1-receptor 1 (IL1-R1) and of IL-1 $\alpha$  in lumbar DRG was assessed by real-time PCR during AIA after 6-8 h and at days 1, 3 and 21. The mRNA-expression of IL1-R1 showed no change on both sides. However IL-1 $\alpha$  mRNA-expression 8-fold decreased ipsilaterally in the acute phase of the AIA (day 1 and 3) and increased 4-fold contralaterally on the day 21, compared to basal expression. It may be speculated, therefore, that IL-1 $\alpha$  plays a role in the generation of bilateral pain and inflammation processes.

Additionally to the mRNA-expression, the nociceptive behaviour of animals was monitored before there were killed. In parallel with the increasing expression of TNF- $\delta$  mRNA and protein in the acute phase of AIA the animals exhibited limping and asymmetric load of the hind and an increase of the diameter of the inflamed ipsilateral knee. At the ipsilateral paw the mechanical as well as the thermal withdrawal threshold decreased in the acute phase of the AIA decreased. Thus the occurrence of TNF- $\delta$  and pain behaviour are correlated.

## **1. Einleitung**

### **1.1. Nozizeption und Schmerz**

#### **1.1.1. Der Schmerz und seine Bedeutung**

Schmerz ist in erster Linie ein Warnzeichen vor eventuellen gewebeschädigenden Einflüssen und löst eine Gegenreaktion, wie z.B. Schutzreflexe aus. Man spricht in diesem Fall vom physiologischen Schmerz. Der pathophysiologische Schmerz zeigt dem Organismus krankhafte Veränderungen an, wie eine Verletzung und Entzündung und ist häufig von einer peripheren und zentralen Sensibilisierung des nozizeptiven Systems begleitet (siehe 1.1.5.). Der neuropathische Schmerz geht auf die Schädigung von Nervenzellen des nozizeptiven Systems selbst zurück.

Neben der oben genannten Einteilung kann man Schmerz auch nach dem Entstehungsort klassifizieren. Grundsätzlich unterscheidet man den somatischen und den viszerale Schmerz (Eingeweideschmerz). Der somatische Schmerz lässt sich zudem in den Oberflächenschmerz der Haut, der zunächst hell und spitz (I. Schmerz) und später dumpf und bohrend (II. Schmerz) ist, und den tiefen Schmerz von Muskeln, Bindegewebe, Gelenken und Knochen einteilen. Der Eingeweideschmerz ist generell schwer zu lokalisieren und überträgt sich auf somatische Areale desselben Rückenmarksegments durch konvergente synaptische Verschaltungen der Spinalnerven auf gleiche Rückenmarkneurone des Hinterhorns.

Schmerz, insbesondere Tiefen- und Eingeweideschmerz sowie der 2. Oberflächenschmerz, ist oft gekennzeichnet durch Unlustbetontheit, einer sog. affektiven Schmerzkomponente, und kann auch vegetative Reaktionen durch die Aktivierung des autonomen Nervensystems auslösen wie Übelkeit, Schwitzen, Herzrasen und Blutdruckabfall (Mutschler et al. 2007).

#### **1.1.2. Allgemeine Reizaufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung**

Aktuell oder potentiell schädigende Reize werden durch spezialisierte primär afferente Nervenfasern (Primärafferenzen) des peripheren Nervensystems aufgenommen und weitergeleitet. Diese Nervenfasern, auch Nozizeptoren genannt, nehmen Reize durch freie sensorische Nervenendigungen im Gewebe auf. Nozizeptoren sind pseudounipolare Nervenzellen deren Zellkörper im Hinterwurzelganglion lokalisiert sind. Die Axone sind entweder nur von einer Schwannzelle ummantelt, d.h. sie sind unmyelinisiert, oder sie besitzen eine dünne Myelinschicht. Erstere sind so genannte C-Fasern mit einer Leitungsgeschwindigkeit von ca. 0,5 – 2 m/s. Zweitere, sog. A $\delta$ -Fasern, leiten das Aktionspotential mit einer Geschwindigkeit

von 10 – 40 m/s. Das Versorgungsgebiet eines Nozizeptors mit seinen Nervenendigungen im Gewebe wird als rezeptives Feld bezeichnet. Nozizeptoren sind hochschwellige Sensoren, die erst durch intensive thermische, mechanische oder chemische Reize erregt werden. Zusätzlich gibt es sog. „stumme“ Nozizeptoren, die erst nach Sensibilisierung z.B. bei Entzündungen aktiviert werden. Viele Nozizeptoren nehmen zwei oder drei Reizqualitäten auf (sog. polymodale Nozizeptoren), andere sind spezialisiert auf eine Qualität. Die Erregung der Nozizeptoren wird über die Hinterwurzeln (*Radix dorsalis*) in das Hinterhorn des Rückenmarks, einen Teil der grauen Substanz, fortgeleitet. In oberflächlichen und tiefen Schichten des Hinterhorns findet die erste synaptische Umschaltung auf das 2. Neuron statt. Die Axone vieler zweiter Neurone ziehen über die *Commissura grisea* auf die kontralaterale Seite um im Vorderseitenstrang zum Thalamus oder zur *Formatio reticularis* aufzusteigen. Im Thalamus werden die Fasern auf das 3. Neuron umgeschaltet, dessen Fasern vorwiegend in den primären und sekundären somatosensorischen Kortex (S1- und S2-Region) ziehen und für die bewusste Schmerzlokalisation verantwortlich sind. Die Fasern, die in der *Formatio reticularis* des Hirnstammes enden, haben allgemeine integrierende Aufgaben. Neben den aufsteigenden Bahnen gibt es auch absteigende hemmende Bahnen vom Hirnstamm z.B. dem *peri aquäduktalen Grau* und der *Formatio reticularis*. Die Fasern der deszendierenden Hemmung enden vor allem an spinalen Interneuronen. Durch deren andauernde hemmende (tonische) Wirkung auf Rückenmarkszellen wird die Antwortschwelle auf noxische Reize angehoben (Schaible and Schmidt 2005; Mutschler et al. 2007).

### **1.1.3. Erregungsübertragung**

Der wesentliche Transmitter in Nozizeptoren des peripheren Nervensystems ist das Glutamat. Die synaptische Übertragung im Rückenmark der nozizeptiven C- und A $\delta$ -Fasern und auch anderer sensibler A $\delta$ - und A $\beta$ - Fasern erfolgt neben der nozizeptionsspezifischen Neuronen, auch auf die gleichen spinalen Neurone im Rückenmark. Es handelt sich dabei um sog. *Wide-Dynamic-Range*-Neurone (WDR), die über die Aktionspotentialfrequenz eine Information über die Art des Reizes angeben (Coste et al. 2008). Die Größe des exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP) ist abhängig davon welche Glutamatrezeptoren bei der synaptischen Erregungsübertragung geöffnet werden. Es gibt ionotrope NMDA- (N-Methyl-d-Aspartat-) und non-NMDA-Glutamatrezeptoren (AMPA- [ $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-Propionsäure] und Kainat-Rezeptoren) sowie metabotrope Glutamatrezeptoren. Wird z.B. an der Haut nicht-noxisch mechanisch gereizt, werden nur mechanosensitive A $\beta$ -Fasern akti-

viert. An der synaptischen Endigung wird dabei nur wenig Glutamat freigesetzt, sodass lediglich non-NMDA-Kanäle an der postsynaptischen Membran geöffnet werden und die Membran nur wenig depolarisiert. Wird jedoch z.B. noxisch-mechanisch gereizt, schütten die Nozizeptoren, sofern es sich um peptiderge Neurone handelt, neben Glutamat zusätzlich Neuropeptide wie Substanz P und CGRP (*Calcitonin-Gen-Related-Peptide*) aus, die postsynaptisch binden. Dadurch wird die postsynaptische Membran soweit depolarisiert, dass die mit einem  $Mg^{2+}$ -Ion verschlossenen NMDA-Kanäle bei einer Depolarisation von -20 mV geöffnet werden. Es fließt zusätzlich zu  $Na^+$  auch  $Ca^{2+}$  in die Zelle. Die Membran wird noch stärker depolarisiert und  $Ca^{2+}$  wirkt als *second messenger* auf Stoffwechselprozesse, das zu einer lang andauernden Effizienzsteigerung der Erregungsübertragung führt. Zusätzlich kann durch Substanz P der metabotrope Neurokinin1-Rezeptor aktiviert werden, was zu einer langsamen, aber lang anhaltenden Depolarisation des Neurons führt. Zusätzlich kommt es durch wiederholte noxische Reizung und die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren zum sog. *wind-up*-Phänomen, der Steigerung der Antwort des WDR-Neurons. Außerdem gibt es noch segmentale inhibitorische Interneurone, die als Transmittersubstanzen Glycin oder Gamma-Aminobuttersäure (GABA) sowie endogene Opiate ausschütten und somit die Größe der Gesamterregung des Neurons begrenzen (Schaible and Schmidt 2005; Mutschler et al. 2007).

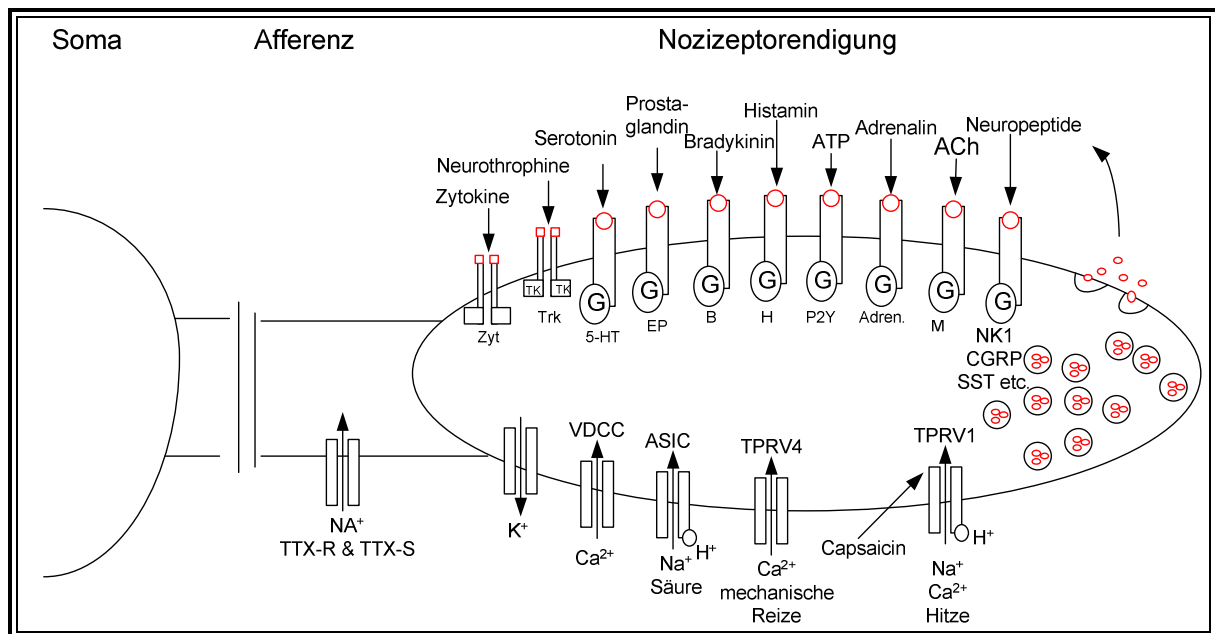
#### **1.1.4. Reizaufnahme an der Nozizeptorendigung**

In Abbildung 1.1. ist eine nozizeptive Endigung mit einer Auswahl von Rezeptoren und Ionenkanälen dargestellt über die noxische Reize transduziert werden können. Alle diese Rezeptoren und Kanäle wurden auch in der Membran am Zellkörper der Spinalganglien nachgewiesen. Im unteren Teil der Zeichnung sind verschiedene Ionenkanäle, im oberen Teil Rezeptoren für verschiedene Mediatoren eingezeichnet. Nicht immer werden alle Rezeptoren und Kanäle an einer Zelle exprimiert.

Die Reizaufnahme nozizeptiver thermischer, mechanischer und chemischer Reize ist nur zum Teil bekannt. Bei der Aufnahme von schädlichen Hitzereizen (ab etwa 45 °C) spielt ein Ionenkanal der TRPV1-Rezeptor (*transient receptor potential vanilloid 1*) eine wesentliche Rolle. Der Kanal öffnet bei Hitze, reagiert aber auch auf Säure bzw. Protonen und Liganden, wie Capsaicin oder Vanilloid.

Für die Wahrnehmung von mechanischen noxischen Reizen wird ein weiterer TRP-Kanal, der TRPV4, diskutiert. Mechanische Noxen öffnen die TRPV4-Kanäle und führen zum Einströ-

men von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und zur Depolarisation der Membran (Suzuki et al. 2003; Alessandri-Haber et al. 2008)



**Abb. 1.1: Darstellung einer freien Nozizeptorendigung mit angedeuteter Affferenz und Soma.** Im oberen Teil der Nozizeptorendigung sind verschiedene Rezeptoren für unterschiedliche Mediatoren, im unteren Teil sind Ionenkanäle und an der rechten Seite mit Neuropeptiden gefüllte Vesikel dargestellt. Oben: G-Protein gekoppelte Rezeptoren: 5-HT Serotoninrezeptor, EP Prostaglandinrezeptor, B Bradykininrezeptor, H Histaminrezeptor, P2Y purinergischer Rezeptor für ATP, Adren Adrenorezeptor, M muskarinischer Rezeptor, NK1 Neurokinin-1-Rezeptor für Substanz P, CGRP-Rezeptor für Calcitonin gene-related peptide, SST Somatostatinrezeptor; Trk Tyrosinkinase Rezeptor, Zyt Zytokinrezeptor; Unten: TTX-resistente (TTX-R) und TTX-sensitive (TTX-S)  $\text{Na}^+$ -Kanal, VDCC Voltage-dependent calcium channel, ASIC Acid sensitive ion channel, TRPV1 und 4 Transient receptor potential V1- und V4-Rezeptor (in Anlehnung an die Abbildungen in Schaible et al. 2002; Mutschler, 2007)

Die Chemosensibilität wird durch verschiedene Rezeptoren vermittelt, die zu einem großen Teil durch G-Protein gekoppelte Signalwege die Freisetzung und Bildung von *second messenger* bewirken und damit letztlich die Öffnung von Ionenkanälen und die Depolarisation der Membran bewirken. Entzündungsmediatoren z.B. Prostaglandin, Serotonin oder CGRP können den  $\text{Na}^+$ -Einstrom durch die spannungsabhängigen Tetrodotoxin-resistenten  $\text{Na}^+$ -Kanäle (TTX-R), zum Teil auch der Tetrodotoxin-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Kanäle (TTX-S) erhöhen (Black et al. 2004; Natura et al. 2005). TTX-R  $\text{Na}^+$ -Kanäle verringern die Erregungsschwelle bei Entzündungen. Der Anteil TTX-R  $\text{Na}^+$ -Kanäle ist in kleinen  $\text{A}\delta$ - und C-Neuronen größer als in mittleren und großen  $\text{A}\beta$ - und  $\text{A}\alpha$ -Neuronen. TTX-S  $\text{Na}^+$ -Kanäle sind in allen Nervenfasern vorhanden. TTX-R  $\text{Na}^+$ -Kanäle scheinen in C-Fasern an der Auslösung von Aktionspotentia-

len beteiligt zu sein (McCleskey and Gold 1999; Baker and Wood 2001). Des Weiteren gibt es pH-Wert abhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle, die bei niedrigem pH-Wert öffnen – *Acid sensing ion channel* (ASIC). ASIC wurden in kleinen Spinalganglienneuronen nachgewiesen. Deren Expression kann durch Entzündungsmediatoren beeinflusst werden und somit die Erregbarkeit der Neurone modulieren. Außerdem scheinen sie Einfluss auf die Entwicklung oder Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen zu haben (Poirot et al. 2006). Neben  $\text{Na}^+$ -Kanälen sind auch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ - (*voltage-dependent calcium channels*, VDCC) und  $\text{K}^+$ -Kanäle in Nervenzellen exprimiert.

Über die Bindung von Zytokinen und Neurotrophen an ihre Rezeptoren kann durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Expression von weiteren Entzündungsmediatoren (z.B. Zytokine, Chemokine) sowie Rezeptoren usw., die Erregbarkeit der Nozizeptorendigung beeinflusst werden.

Durch die Ausschüttung von Neuropeptiden, wie Substanz P und CGRP aus nozizeptiven Endigungen kann das Gewebe beeinflusst werden (neurogene Entzündung). Da nozizeptive Neurone Autorezeptoren für CGRP (Von Banchet et al. 2002) und Substanz P (von Banchet and Schaible 1999) besitzen, dürfen direkte Rückkopplungsmechanismen angenommen werden.

#### **1.1.5. Mechanismen der peripheren und zentralen Sensibilisierung**

Bei einer Entzündung entwickelt sich häufig eine Hyperalgesie, d.h. schmerzhaft Reize werden schmerzhafter empfunden. Außerdem kann sich eine Allodynie entwickeln, so dass normalerweise nicht schmerzhaft Reize als schmerzhaft empfunden werden. Eine Hyperalgesie kann sich auch auf angrenzende gesunde Bereiche übertragen. Diese sog. sekundäre Hyperalgesie lässt sich als die Ausbreitung des rezeptiven Feldes durch eine zentrale Sensibilisierung erklären. Die periphere Sensibilisierung wird durch die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (siehe 1.1.4.) aus z.B. Makrophagen, Mastzellen, Thrombozyten, Fibroblasten und Granulozyten ausgelöst. Die hohe Erregungsschwelle der Nozizeptoren wird herabgesetzt, die Aktionspotentialfrequenz auf einen Reiz hin nimmt zu. Des Weiteren kommt es zur Aktivierung der „stummen“ Nozizeptoren, da durch die Entzündungsmediatoren deren Erregungsschwelle erniedrigt wird.

Als eine Folge peripherer Sensibilisierung werden oft auch Neurone des zentralen Nervensystems für nozizeptive Reize sensibler. In Abschnitt 1.1.3. ist das Phänomen anhand der veränderten Erregungsübertragung auf das spinale und schließlich das zentrale Neuron (2. und 3.



Neuron) durch unterschiedliche Glutamatwirkung auf die Rezeptoren beschrieben (Schaible et al. 2002; Schaible and Schmidt 2005; Mutschler et al. 2007; Cheng and Ji 2008).

## **1.2. Die Rheumatoide Arthritis**

Die rheumatoide Arthritis (RA) des Menschen ist eine systemische Autoimmunkrankheit unbekannten Ursprungs, an der ca. 1% der Bevölkerung erkrankt. Die Erkrankung des Bindegewebes führt zu chronischen Gelenkentzündungen und zu einer fortschreitenden Zerstörung des Knorpel- und Knochengewebes und dadurch zu einer Fehlstellung der Gelenke. Am Anfang der Erkrankung sind vorwiegend die distalen kleinen Gelenke der Hände und Füße betroffen, im späteren Verlauf können aber alle Gelenke betroffen sein. Die Entzündungen treten dabei im Körper meist symmetrisch auf. Die Krankheit tritt oft in Schüben auf und ist begleitet von allgemeinen Symptomen wie Unwohlsein, Schläppheit und Fieber. Die Krankheit ist neben der Gelenkdestruktion vor allem durch chronische Schmerzen gekennzeichnet, wie vermehrte Ruheschmerzen und Hyperalgesie (Bär et al. 2004).

Die Entzündung, die auf den Knorpel und schließlich den Knochen übergeht, geht von der Synovialmembran aus, einer bindegewebigen Hülle um die Gelenkhöhle. Die Synovialmembran besteht aus einer äußeren Schicht (Membrana fibrosa) aus straffem kollagenen Bindegewebe, der Subintima aus lockerem zellreichen Bindegewebe, das reich an Blut, Lymphgefäßen und Nerven ist, sowie der inneren Schicht (Membrana synovialis), das die Gelenkhöhle auskleidet. Die innere Schicht besteht aus makrophagenähnlichen Typ A- und fibroblastenähnlichen Typ B Synovialzellen. Die Subintima bildet die Gelenkschmiere (Synovia), die den hyalinen Knorpel mit Blutplasmakomponenten ernährt und andererseits Stoffwechselprodukte des Knorpels resorbiert.

Die rheumatoide Arthritis wird durch ein unbekanntes Antigen ausgelöst, wobei verschiedene virale oder bakterielle Infektionen im Zusammenhang mit einer genetischen Disposition diskutiert werden. Dieses Antigen, gebunden an den Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC-Klasse II) an einer Antigenpräsentierenden Zelle (APZ), löst in der Synovialmembran eine CD4<sup>+</sup>-T-Zellreaktion (CD - *Cluster of differentiation*) über den T-Zellrezeptor und den CD4<sup>+</sup>-Rezeptor aus (Villiger und Bernhard 2001). MHC-Klasse II-Proteine werden durch humane Leukozytenantigen-Gene (HLA) exprimiert. Viele Menschen die eine rheumatoide Arthritis entwickeln, exprimieren Subtypen der HLA-DR1-, HLA-DR4- und HLA-DR10-Allele (Roudier 2000; Kapitany et al. 2005). Die aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sezernieren Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). IFN- $\gamma$  aktiviert seinerseits Monozyten und Makrophagen, die pro-

inflammatorisches Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) sezernieren. Dadurch kommt es zur Aktivierung und Einwanderung weiterer Entzündungszellen, z.B. durch Vasodilatation der Gefäße der Subintima und Expression von Adhäsionsmolekülen der Endothelzellen. Auch werden Synovialzellen, Fibroblasten und Osteoklasten aktiviert, die durch weitere Enzym-, Chemokin- und Zytokinfreisetzung den Entzündungsprozess antreiben. Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aktivieren des weiteren B-Lymphocyten, die mit der Produktion von Autoantikörpern reagieren. Bei ca. 60-80% der Patienten treten sog. Rheumafaktoren (RF) auf. Dabei handelt es sich um Immunglobulin M-Antikörper (IgM-Antikörper) gegen das kristallisierbare Fragment (Fc-Teil) von Immunglobulin G (IgG). Ein weiterer Antikörper, der bei ca. 50% der Rheumapatienten vorkommt, ist das *Anti-cyclic citrullinated peptide* (anti-CCP). Als Antigen dienen synoviale Proteine, die die seltene Aminosäure Citrullin, die durch posttranslationale Modifikation aus Arginin erzeugt wurde, enthalten (Bang et al. 2007). Wo bei das Vorkommen eines oder beider Antikörper auch schon in der vorklinischen Phase bei Rheumapatienten mit einem schlimmeren Krankheitsverlauf und frühen Gelenkschädigungen korreliert ist (Nielen et al. 2004).

Durch die beschriebene Entzündungsreaktion kommt es zu einer synovialen Hyperplasie, d.h. einer Zellvermehrung, die auch als Pannus bezeichnet wird. Der Pannus entsteht einerseits durch die fortwährende Entzündung und die dadurch massive Einwanderung von Entzündungszellen wie Makrophagen und Lymphocyten. Andererseits kommt es auch zur Vermehrung der fibroblastenähnlichen Synovialzellen verbunden mit einer herabgesetzten Apoptose (Korb et al. 2009). Der Gelenkspalt verkleinert sich und die Entzündung geht in den Knorpel und den Knochen über. Aktivierte Osteoklasten bauen den Knochen ab, und es kommt zu lokaler Osteoporose. Die Kollagen- und Proteoglykansynthese der Chondrozyten wird gehemmt, die Sekretion von Metallproteinasen erhöht und der hyaline Knorpel dezimiert. Die RA ist, wie bereits erwähnt, durch schmerzhafte Zustände gekennzeichnet. Durch den Druck den das Pannusgewebe und die Synovia ausüben, werden die Nozizeptoren der nervenreichen Synovialmembran, des Periost und des Knorpels auch in Ruhe mechanisch gereizt. Durch die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren werden die Nozizeptoren sensibilisiert und „stumme“ Fasern aktiviert. Es treten primäre und sekundäre Hyperalgesie sowie Allodynie um das entzündete Gelenk herum auf.

### **1.3. Antigen-induzierte Arthritis in der Ratte als Modell für die rheumatoide Arthritis im Menschen**

Die Antigen-induzierte Arthritis (AIA) ist ein experimentelles Tiermodell der rheumatoiden Arthritis und gehört zu den immunologisch induzierten Arthritismodellen. Die Tiere werden zunächst zweimal durch subcutane Injektion eines Antigens, meist methyliertes Kälberserumalbumin (m-BSA), vorimmunisiert. Das Emulgieren von m-BSA in kompletten Freund's Adjuvans angereichert mit abgetöteten *Mycobacterium tuberculosis* verstärkt dabei die Immunogenität des Antigens. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wird das Antigen in ein Gelenk intraartikulär injiziert. Mit einer Inzidenz von nahe 100% entwickelt sich eine akute Arthritis (Bendele 2001). Im Gelenk entsteht eine schwere Entzündung, da durch die Immunisierung mit dem Antigen humorale Antikörper vorliegen. Es tritt eine lokale Ablagerung von Antigen:Antikörper-Immunkomplexen auf, die zur Komplementaktivierung und Freisetzung von Chemokinen, Leukozytenanlockung und Gewebszerstörung durch Leukozytenenzyme führt (Janeway et al. 2002). Das heißt, im Gelenk wird eine Arthritis mit Pannusbildung, Knochen- und Knorpeldestruktion ausgelöst, ähnlich wie bei der RA des Menschen. Die Vorteile des AIA-Modells sind unter anderen, dass die Erkrankung chronifiziert und die AIA nur in einem Gelenk ausgelöst wird. Das Gelenk auf der kontralateralen Seite dient somit als wichtige Referenz, um bilaterale segmentale Prozesse untersuchen zu können (Shenker et al. 2003).

### **1.4. Zytokine**

Bei Zytokinen handelt sich um zuckerhaltige Polypeptide bzw. Proteine mit einem Molekulargewicht unter 30 kDa, geringer Halbwertszeit, niedriger Wirkkonzentration und sehr spezifischer Bindung. Zytokine wirken regulierend auf Wachstums- und Differenzierungsprozesse von Körperzellen. Aber vor allem wirken sie auf Zellen des Immunsystems und werden vorwiegend von diesen gebildet und ausgeschüttet. Zytokine sind wichtig für die Regulierung der Abwehr von Krankheitserregern und anderen Fremdstoffen im Körper und helfen bei der Wundheilung. Sie verbreiten sich meist nicht über das Blut, sondern wirken unmittelbar auf ihre Nachbarzellen oder auf die ausschüttende Zelle selbst zurück, also parakrin und autokrin. Sie können eine pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Wirkung haben. Die fünf großen Hauptgruppen der Zytokine sind: Interferone, Interleukine, koloniestimmulierende Faktoren, Chemokine und Tumornekrosefaktoren.

Die Interferone IFN- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  haben eine antivirale und antitumorale Wirkung auf Körperzellen. Die Interleukine spielen eine Rolle bei der Kommunikation zwischen Leukozyten, aber auch anderen Immunzellen. Bisher sind über 35 Interleukine bekannt. Die Rolle speziell des IL-1 $\beta$  wird im Abschnitt 1.7. aufgegriffen. Die koloniestimulierenden Faktoren sind Wachstumsfaktoren der roten und weißen Blutkörperchen, wie Erythropoietin und Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor (G-CSF). Chemokine werden von Immun- und Gewebezellen gebildet und bewirken Migrationsbewegungen von Immunzellen aus dem Blut und innerhalb des Gewebes entlang eines Konzentrationsgradienten.

### **1.5. Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$**

Die Tumornekrosefaktoren allgemein sind Zytokine die von Zellen des Immunsystems sezerniert werden. Es sind Signalstoffe des Immunsystems, die bei lokalen und systemischen Entzündungen eine Rolle spielen. Sie kommen in einer membrangebundenen oder löslichen Form vor und binden an ihre entsprechenden Rezeptoren meist als Homotrimer. Bekannte Tumornekrosefaktoren sind Liganden, die an verschiedene Rezeptoren der TNF-Ligandenfamilie binden wie Liganden des *Cluster of differentiation* CD27L, CD30L, CD40L oder FASL (CD95), TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) und die teilweise TNF- $\alpha$  redundanten Zytokine Lymphotoxin- $\alpha$  und - $\beta$ .

Humanes TNF- $\alpha$  ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert (Spies et al. 1989). Das 26 kDa (233 As) große translatierte Protein ist ein integrales transmembrangängiges Protein (mTNF- $\alpha$ ) (Kriegler et al. 1988), das durch eine Protease *TNF- $\alpha$  converting enzyme* (TACE) in ein lösliches 17 kDa (157 As) großes Protein (sTNF- $\alpha$ ) gespalten werden kann (Moss et al. 1997). Beide Formen können immunregulatorisch, inflammatorisch, proliferatorisch, zytotoxisch aber auch systemisch wirken. Sie wirken entweder über Zell-Zellkontakte oder im unmittelbaren Bereich des Wirkungsortes aktivierter Monozyten und Makrophagen (Kriegler et al. 1988). Systemisch kann TNF- $\alpha$  eine Apoptose von Tumorzellen, bei längerer Einwirkung mit niedriger Konzentration die sog. Auszehrung (Cachexia), Fieber oder bei einer Superinfektion mit Bakterien den septischen Schock auslösen (Beutler und Cerami 1988).

TNF- $\alpha$  wird z.B. als Antwort auf eine Infektion mit gram-negativen Bakterien produziert, als Reaktion der angeborenen Immunität auf den Lipopolysaccharidmatrix (LPS) der Bakterienwand, die dann auch die adaptive Immunität aktiviert (Janeway et al. 2002). TNF- $\alpha$  bindet an zwei Oberflächenrezeptoren, den 55 Kilodalton (kDa) großen TNFR1 und den 75 kDa großen

TNFR2, die an verschiedenen Körperzellen exprimiert sein können (Tartaglia et al. 1991). Die verschiedenen Aufgaben der Rezeptoren werden im nächsten Kapitel behandelt.

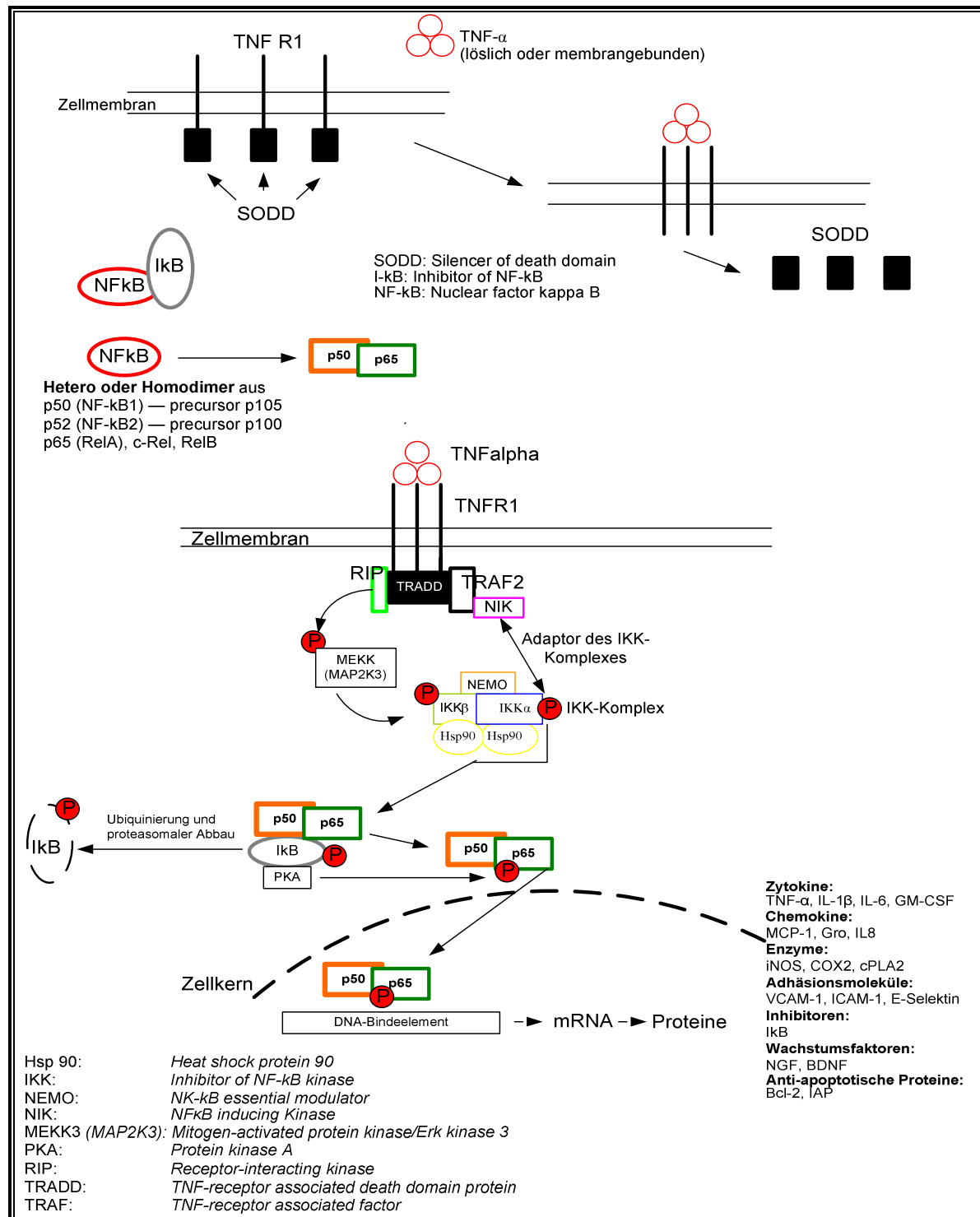
### **1.6. Signaltransduktionswege der TNFR1- und TNFR2-Rezeptoren**

TNFR1 und TNFR2 gehören zur TNF-Rezeptor-Superfamilie. Die meisten Mitglieder dieser Familie haben extrazellulär eine sich wiederholende cysteinreiche Sequenz, die typischerweise aus sechs Cysteinresten und 40 weiteren Aminosäuren besteht (Smith et al. 1994). Die TNF-Rezeptoren haben keine katalytische Wirkung sondern wirken nach der Bindung des trimerisierten sTNF- $\alpha$  oder mTNF- $\alpha$  über assoziierte Proteine vor allem auf Transkriptionsfaktoren. Die Bindung bewirkt die Assoziierung dreier Rezeptoren zum aktivierten Rezeptorkomplex. TNFR2 scheint nur über mTNF- $\alpha$  voll aktiviert zu werden, also über Zell-Zell-Kontakte (Grell et al. 1995). Der TNFR1 scheint in allen Geweben exprimiert zu werden, wohingegen der TNFR2 hauptsächlich in Immunzellen, wie Thymozyten und T-Zellen vorzukommen scheint (Wajant et al. 2003; Grech et al. 2005). TNFR1 ist in neuronalen Zellen exprimiert, über die Expression von TNFR2 in Neuronen gibt es unterschiedliche Aussagen. Wir und andere Arbeitsgruppen haben TNFR1 und TNFR2 in Spinalganglien der Ratte nachgewiesen (Pollock et al. 2002; Schäfers et al. 2003a; Schäfers et al. 2003b; Böttger et al. 2008). Es gibt jedoch auch Arbeiten, die TNFR2 nur in nicht-neuronalen Zellen nachweisen (Li et al. 2004; Inglis et al. 2005).

TNFR1 kann Apoptose auslösen, aber auch über verschiedene Wege NF $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), sowie die c-Jun N-terminal kinase (JNK) und die p38-Kinase aktivieren (Haas et al. 1999). Beide Rezeptoren können durch Proteasen geschnitten werden und in der löslichen Form regulierend auf TNF- $\alpha$  ausgelöste Prozesse einwirken (Wajant et al. 2003).

Der TNFR1 besitzt an der zytoplasmatischen Seite eine sog. *death domain* (DD), die bei entsprechender Assoziierung von Proteinen Apoptose auslösen kann.

In Abbildung 1.2 sind schematisch die wichtigsten Schritte der NF $\kappa$ B-Aktivierung nach Bindung von TNF- $\alpha$  dargestellt. Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B bildet Homo- oder Heterodimere aus folgenden Proteinen: NF $\kappa$ B1/p50 aus p105, NF $\kappa$ B2/p52 aus p100, c-Rel, RelA/p65 und Rel B. In Neuronen werden hauptsächlich die p50 und p65 Untereinheit von NF $\kappa$ B exprimiert (Mattson 2005).



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung des NFκB-Signaltransduktionsweges nach Bindung von TNF-α an TNFR1.** Nach Dissoziation von SODD bindet TRADD an TNFR1 und daran *death domain* (DD) besitzende Proteine wie TRAF2 und RIP. TRAF2 bindet NIK und das wiederum den IKK-Komplex. Der IKK-Komplex besteht aus zwei I-κB-Kinasen (IKK), z.B. IKKα und β, dem regulatorischem NEMO-Protein sowie dem Homodimer des Hitzeschockprotein Hsp 90 und anderen. NIK phosphoryliert IKKα. RIP phosphoryliert über MAP2K3 die IKKβ. Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert den IκB, der sich von NFκB, einem Heterodimer aus p50 und p65, löst und degradiert wird. Die PKA phosphoryliert p65 und aktiviert damit NFκB. (Abbildung in Anlehnung an Takada et al. 2003 und Wajant et al. 2003)

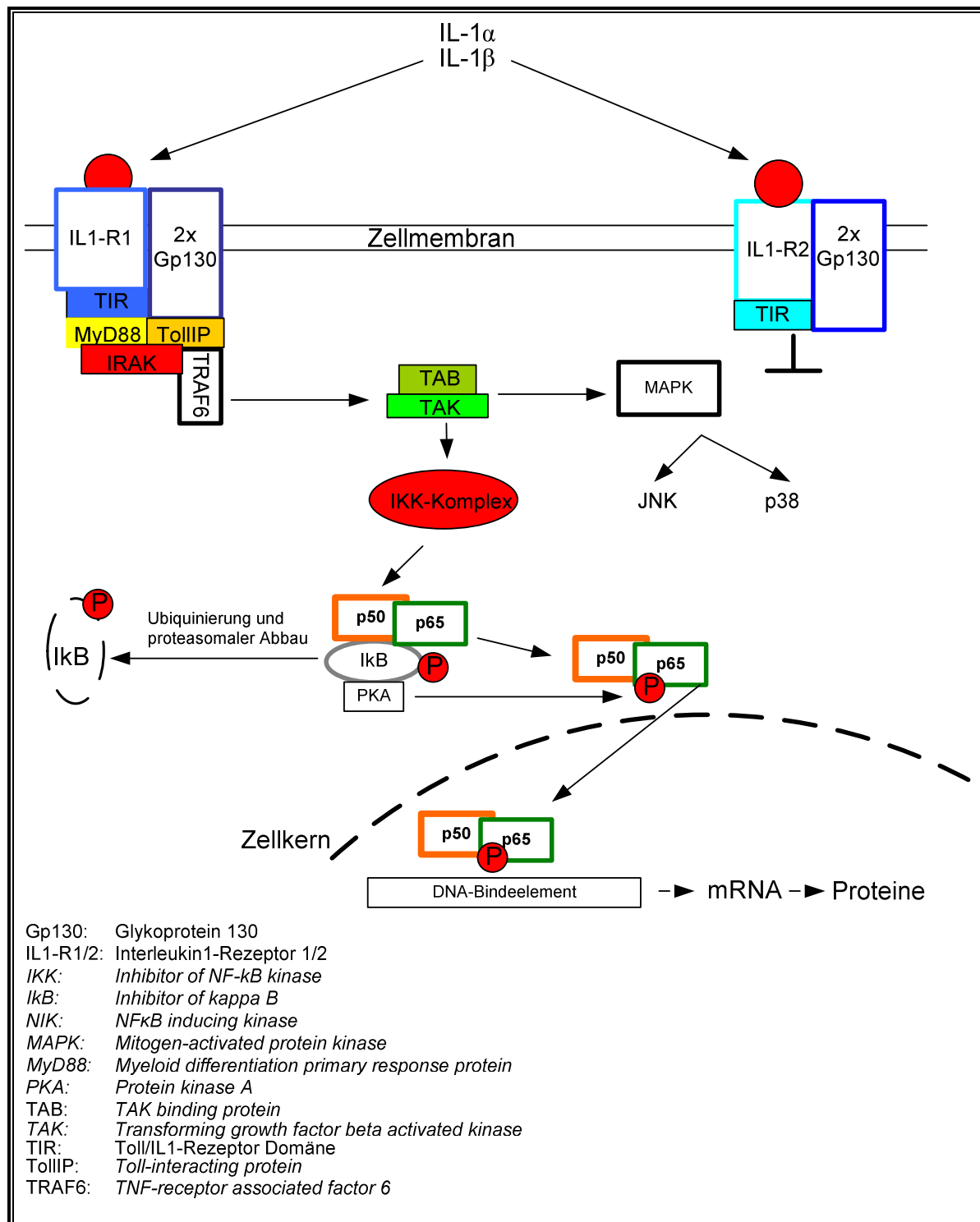
NFκB bindet im Zellkern an entsprechende DNA-Bindeelemente und löst die Transkription verschiedener Proteine aus: Zytokine, Chemokine, Enzyme, Adhäsionsmoleküle, Inhibitoren, Wachstumsfaktoren (z.B. NGF) und Anti-apoptotische Proteine (z.B. Bcl-2, IAP [*B-cell lymphoma 2, inhibitor of apoptosis protein*]) und andere (Haas 1999; Wajant et al. 2003).

Der Signalweg über die JNK/SAP-Kinase (*stress activated protein kinase*), ein Mitglied der *mitogen activated protein kinase*-Familie (MAPK), kann unter anderem über verschiedene Arten von zellulärem Stress und inflammatorische Zytokine, insbesondere durch TNF-α, aktiviert werden. An deren Ende kann dann die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Jun, AP1 (*activator of protein 1*) oder wieder NFκB stehen. Die MAP-Kinase p38 wird über *receptor-interacting kinase* (RIP), MAPK/ERK-Kinase-Kinase3/4 oder 6 (MEKK3/4 oder 6; ERK *extracellular signal regulated protein kinase*) aktiviert und kann selbst verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren, neben anderen auch p65 (Moriguchi et al. 1997; Wajant et al. 2003).

TNFR2 induziert ebenfalls den NFκB- und JNK-Weg, wobei noch nicht viele Einzelheiten bekannt sind. TNFR2 besitzt keine Todesdomäne und kann nicht unmittelbar Apoptose auslösen. Die Aktivierung von NFκB schließt neben anderen Kinasen wie MEKK1, *NFκB inducible*-Kinase (NIK) und TRAF2-associated Kinase (T2K) ein. Die Aktivierung von NFκB ist unter physiologischen Bedingungen aber eher schwach und konnte vorwiegend an überexprimierten Zellen gezeigt werden (Seitz et al. 2001; Grech et al. 2005).

### **1.7. IL-1β und die IL1-Rezeptoren**

Das IL-1β, ursprünglich als *lymphocyte activating factor* (LAF) bezeichnet, wird hauptsächlich durch aktivierte Monozyten, vor allem Blutmonozyten, und Makrophagen produziert. Die Aktivierung erfolgt z.B. nach LPS-Kontakt über den Toll-like Rezeptor 4. Humanes IL-1β ist auf dem Chromosom 2 codiert und wird als ca. 30 kDa (288 AS) großes Vorläuferprotein translatiert. Das Vorläuferprotein wird durch *IL-1β-converting enzyme* (ICE; auch bekannt als caspase-1) in funktionstüchtiges IL-1β (158 AS, 17 kDa) gespalten und sezerniert (Fantuzzi und Dinarello 1999). Das Enzym Caspase-1 hat somit sowohl pro-apoptotische als auch entzündungsfördernde Eigenschaften (Raupach et al. 2006). IL-1β bindet an zwei transmembranale Rezeptoren, wobei IL1-Rezeptor 1 (IL1-R1) das Signal weiterleitet, der IL1-Rezeptor 2 (IL1-R2) lediglich IL1 bindet. Beide Rezeptoren existieren auch in einer löslichen Form und stellen eine Art Puffersystem der IL1-Wirkung dar. Ein natürlicher IL1-Rezeptor Antagonist (IL1-Ra) begrenzt zusätzlich die IL-1β Wirkung.



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung des NF $\kappa$ B-Signaltransduktionsweges nach Bindung von IL-1 $\beta$  an IL1-R1 oder IL1-R2.** Die Bindung von IL-1 $\beta$  an den IL1-R1 führt zur Assoziierung von 2 Molekülen Gp130. An die TIR-Domäne des IL1-R1 kommt es nach Bindung weiterer Proteine zur TRAF6-Assoziierung. TRAF6 aktiviert TAK. Diese Kinase kann durch Phosphorylierung des IKK-Komplexes die Transkription NF $\kappa$ B-assoziiierter Gene bewirken. Außerdem kann über Phosphorylierung von MAP-Kinasen JNK oder p38 aktiviert werden und diese können durch weitere Phosphorylierungen Einfluss auf Zellvorgänge nehmen. (Abbildung in Anlehnung an Akira und Takeda 2004, Guan et al. 2008 und Janeway et al. 2002)



IL-1 $\beta$  bindet neben IL1-Ra außerdem an den löslichen IL1-R2 und konkurriert mit ihm um die Bindung an die transmembranalen Rezeptoren IL1-R1 und IL1-R2 (Dinarello 1996).

Nach der Bindung von IL-1 $\beta$  an einen der beiden Rezeptoren binden zwei Moleküle des Glykoproteins 130 (Gp130) an den Rezeptor und verstärken dadurch die Bindung von IL-1 $\beta$ . An diesen Rezeptorproteinkomplex binden über die Toll/IL1-Rezeptor-Domäne weitere Faktoren, wobei es letztlich über TRAF6 zur Aktivierung des *Inhibitor of NF $\kappa$ B kinase*-Komplex (IKK-Komplex) und zur Freisetzung von NF $\kappa$ B kommt (Janeway et al. 2002). Außerdem kann über die MAPK der JNK- und p38-Weg aktiviert werden. In Abbildung 1.3 sind die wichtigsten Schritte und Proteine der IL-1 $\beta$ -Wirkung schematisch dargestellt.

### **1.8. TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ und das nozizeptive System**

Die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  haben bei der Entstehung von Entzündungen und Schmerzen eine große Bedeutung. Die typischen entzündungsfördernden Zytokine werden schnell von Immunzellen freigesetzt und sorgen für die Aktivierung weiterer Immunzellen und des Immunsystems allgemein. TNF- $\alpha$  bewirkt dabei die Produktion von IL-1 $\beta$  (Dinarello et al. 1986) und IL-1 $\beta$  kann seine Produktion selbst induzieren (Dinarello et al. 1987). Die Zytokine haben Einfluss auf die Entwicklung einer Entzündung, haben aber auch direkt Einfluss auf die Schmerzentstehung. Wird TNF- $\alpha$  in gesundes Gewebe injiziert, entstehen mechanische und thermische Hyperalgesien (Cunha et al. 1992; Watkins et al. 1994). Viel ist bekannt über den Einfluss von Zytokinen bei der Entstehung von neuropathischen Schmerzen, gekennzeichnet durch Allodynie und Hyperalgesie, die durch die Verletzung oder Durchtrennung eines peripheren Nervens entstehen kann. Die Applikation von TNF- $\alpha$  in die Nähe des Nervenstumpfs erzeugt bei wachen Ratten akute mechanische Hyperalgesie (Sorkin und Doom 2000). Bei einer isolierten Nervfaser können ektopische Entladungen stattfinden. TNF- $\alpha$ -Gabe an einen Nerven kann thermische Hyperalgesie auslösen, sowie den Nerv durch Degeneration des Axons und Demyelinisierung zerstören (Sorkin et al. 1997). Im CCI-Model, *chronic constriction injury*, wird der Nerv gequetscht. Endogenes TNF- $\alpha$  konnte nach ca. 20 h durch anterograden Transport vom Soma an die Stelle der Verletzung immunhistochemisch nachgewiesen werden, ebenso eine verstärkte TNF- $\alpha$  Expression im Neuron selbst (Schäfers et al. 2002). Die Langzeitzugabe von TNF- $\alpha$  über 24 h zu kultivierten Spinalganglien erhöht den Anteil TRPV1-positiver Neurone. Der TRPV1-Kationenkanal ist verantwortlich für die Vermittlung noxischer Hitzereize (Hensslekk et al. 2007). Die Reaktionsschwelle auf noxische Reize wird nach Applikation von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im peripheren Nerv erniedrigt (Ferreira et al. 1988;

Schweizer et al. 1988; Follenfant et al. 1989; Cunha et al. 1992). Etanercept und Infliximab sind Medikamente die speziell TNF- $\alpha$  blocken bzw. aus dem System entfernen. Diese Medikamente zeigen schmerzlindernde Wirkung im Laufverhalten der Ratten mit einer AIA ohne jedoch die Entzündung selbst oder die Gelenkdestruktion zu verhindern oder signifikant abzuschwächen (Böttger et al. 2008). Elektrophysiologische Ableitungen an C-Fasern im Kaolin/Carrageenan-entzündeten Knie der Ratte zeigen mit Etanerceptgabe auf mechanische Reize eine reduzierte Aktionspotentialfrequenz innerhalb vom 30 min (Böttger et al. 2008). TNF- $\alpha$ , appliziert in die Mauspfote, verursacht Hyperalgesien auch in der kontralateralen Pfote und erhöht die IL-1 $\beta$ -Konzentration auf beiden Seiten (Russell et al. 2009). Im CCI-Modell konnte durch Blockierung des NMDA-Rezeptors dieser Effekt unterdrückt werden, was auf spinale Mechanismen verweist (Kleinschnitz et al. 2005). TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  können durch länger währende Hochregulierung der Expression von Entzündungsmediatoren zur Schmerzentscheidung beitragen, z.B. durch Zunahme der NGF-Konzentration (*nerv growth factor*) (Safieh-Garabedian et al. 1995), der Prostaglandin E<sub>2</sub>-Konzentration über die Aktivierung der Cyclooxygenase 2 (Maier et al. 1990) oder auch der Substanz P-Freisetzung über die Aktivierung der Cyclooxygenase 2 (Inoue et al. 1999). Aber auch kurzfristige direkte Einflüsse auf Nozizeptoren sind möglich. Zum Beispiel erhöht TNF- $\alpha$  den TTX-R Natriumstrom über p38 (Jin und Gereau 2006). IL-1 $\beta$  kann bei in vitro Applikation den Hitze abhängigen Einwärtsstrom über Proteinkinasen, wie PKC, erhöhen (Obreja et al. 2002). IL-1 $\beta$  erhöht die Erregbarkeit von Nozizeptoren über p38, indem die langsame Inaktivierung des TTX-R Natriumkanal verlangsamt wird und der Strom des persistenten TTX-R Kanals bei gleich bleibender Spannungsschwelle erhöht wird (Binshtok et al. 2008).

Unterschiedliche Aussagen gibt es über die Expression der TNF-Rezeptoren im Spinalganglion. Nach Abschnürung eines spinalen Nervens (SNL, *spinal nerve ligation*) konnte durch Immunhistochemie eine Hochregulation beider TNF-Rezeptoren nach 6 h und 24 h in Spinalganglienneuronen des verletzten Nervs und im benachbarten unverletzten Nerv gezeigt werden. Eine schwache Grundexpression beider Rezeptoren konnte auch ohne Nervenligation beobachtet werden. Gleichzeitig mit der TNF-Rezeptor-Hochregulation nahm die mechanische Allodynie zu (Schäfers et al. 2003b). Im CCI-Modell konnte immunhistochemisch nach 3-5 Tagen eine Hochregulation beider Rezeptoren im Neuron gezeigt werden. Auch axonal nach CCI und TNF- $\alpha$  Injektion in den gesunden Nerv konnten beide Rezeptoren lokalisiert werden (Shubayev und Myers 2001). In kultivierten neonatalen Spinalganglienneuronen wurden mit Immunmarkierung durch Confocalmikroskopie und FACS-Analysen (*fluorescence activated cell sorting*), sowie durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beide Rezeptoren

nachgewiesen (Pollock et al. 2002). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte beide Rezeptoren immunhistochemisch in Paraffinschnitten von Spinalganglienneuronen erwachsener Ratten sowie durch *real-time* PCR nachweisen (Böttger et al. 2008). Nach Auslösung einer Arthritis durch *complete Freund's adjuvant* (CFA-Modell) wurde im akuten Stadium an Schnitten von Spinalganglien der TNFR1 an neuronalen Zellen, durch *in situ* Messenger-RNA-Expression (mRNA), nachgewiesen. Der TNFR2 wurde nur in nicht neuronalen Zellen, an aktivierte, Monozyten und Makrophagen, nachgewiesen. Dies wurde auch mittels *real-time* PCR festgestellt (Inglis et al. 2005).

### **1.9. Zielstellung der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Hinweise für eine unmittelbare Interaktion der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  mit dem peripheren sensorischen Nervensystem zu erhalten. Deshalb sollte zunächst der immunhistochemische Nachweis und die Identifizierung beider TNF-Rezeptoren in Paraffinschnitten von Spinalganglienneuronen der Ratte durchgeführt werden. Der Anteil TNFR1- und TNFR2-positiver Neurone im Schnitt soll berechnet und eine Auswertung der Größenzusammensetzung durchgeführt werden. Es sollte versucht werden, Zusammenhänge zwischen der Größe der positiven Neurone und der Möglichkeit des direkten Einflusses auf Nozizeptoren über TNF- $\alpha$  Bindung herzustellen. Da TNFR1- und TNFR2-*knockout* Mäuse zur Verfügung standen, sollte außerdem die Spezifität der Antikörper gegen beide Rezeptoren getestet werden. Im nächsten Schritt wird versucht, die Neuronengruppe, die TNF-Rezeptoren exprimieren, näher zu charakterisieren. So können TNF-Rezeptor-positive Neurone durch eine Doppelmarkierung mit einem Antikörper gegen TRPV1, den unspezifischen Kationenkanal (wichtig für die Vermittlung von noxischen Hitzereizen) charakterisiert werden. Außerdem sollte eine Doppelmarkierung von TNF-Rezeptoren und dem Isolectin IB4 durchgeführt werden. IB4 ist ein Marker für nicht-peptiderge, unmyelinisierte Neurone und kennzeichnend für einen Teil von C-Faserneuronen.

Nachdem diese Grunddaten erhoben worden waren, sollte geklärt werden, ob sich die Expression von TNF-Rezeptoren im Verlauf einer Antigen-induzierten Arthritis (AIA), ein Modell für die rheumatoide Arthritis beim Menschen, verändert. Dazu wurde bei Lewisratten im linken Knie eine AIA ausgelöst. Die Tiere sollten zu verschiedenen Zeitpunkten getötet werden. An Paraffinschnitten der Spinalganglien sollte im zeitlichen Verlauf die Anzahl positiver TNFR1- und TNFR2-Neurone ausgewertet werden. Parallel dazu sollte eine Markierung von

TNF- $\alpha$  während einer AIA durchgeführt werden, um zu untersuchen ob und wie sich die Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Neurone in der AIA verändert.

Der immunhistochemische Nachweis der TNF-Rezeptoren und des TNF- $\alpha$  lässt keine Aussagen zu, ob sich z.B. die Proteinexpression in den individuellen Zellen ändert. Um einen Hinweis zu erhalten auf welcher Ebene eventuelle veränderte Proteinexpressionen reguliert werden, sollten Transkriptionsunterschiede der mRNA von Spinalganglien mit Hilfe der *real-time* PCR im Verlauf einer AIA untersucht werden. Neben den TNF-Rezeptoren und TNF- $\alpha$  sollte auch der IL1-R1 und IL-1 $\beta$  einbezogen werden.

An immunisierten Tieren und Tieren mit einer AIA sollten vor dem Töten Verhaltenversuche und Messungen durchgeführt werden, um im Schonverhalten der Tiere, sich entwickelnde sekundäre thermische und mechanische Hyperalgesien und Entzündungszeichen während der AIA nachzuweisen.

Die Charakterisierung der Spinalganglienneurone, die TNF-Rezeptorproteine exprimieren soll zunächst im Vordergrund der Arbeit stehen. Die Proteinexpression des Zytokins TNF- $\alpha$  und der Rezeptoren während der AIA soll sich anschließen. Die Expression dieser Gene auf mRNA-Ebene plus IL-1 $\beta$  und IL1-R1 soll Hinweise auf die Regulation der Faktoren liefern. Die mit der AIA durchgeführten Verhaltenversuche sollen den Krankheitsverlauf dokumentieren.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Materialien**

#### **2.1.1. Chemikalien und Laborbedarf**

Aurion Conventional Gold Reagent	Aurion (Wageningen, Niederlande)
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, BRD)
<i>Cellsafe Biopsy Capsule</i>	Leica Microsystem (Wetzlar, BRD)
Desoxyribonuclease I (RNase-free)	Fermentas (Vilnius, Litauen)
Desoxynukleosid-Triphosphate	Fermentas (Vilnius, Litauen)
Dulbecco's Modified Eagle Medium PAA	Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Entelan	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma Chemie GmbH (München, BRD)
Ethidiumbromide	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, BRD)
Fluorescein NIST-Traceable Standard	Invitrogen (Carlsbad, CA)
<i>complete Freund's adjuvant</i>	Sigma Chemie GmbH (München, BRD)
Gelatine vom Kaltwasserfisch	Sigma Chemie GmbH (München, BRD)
Glycin	Sigma Chemie GmbH (München, BRD)
Histosec (Paraffin)	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Jenchrom <sup>TM</sup> px blue Detection System	MoBitec GmbH (Göttingen, BRD)
Natrium-thiopenton (Trapanal)	Byk Gulden (Konstanz, BRD)
methyliertes Kälberserum Albumin	Sigma Chemie GmbH (München, BRD)
O'Gene Ruler <sup>TM</sup> DNA Ladder, Low Range	Fermentas (Vilnius, Litauen)
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen (Carlsbad, CA)
RevertAid <sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (Vilnius, Litauen)
Rinderserumalbumin	Sigma Chemie GmbH (München, BRD)
<i>RiboLock<sup>TM</sup> Ribonuclease Inhibitor</i>	Fermentas (Vilnius, Litauen)

RNeasy <sup>®</sup> Plus Mini Kit	Qiagen GmbH (Hilden, BRD)
Seakem <sup>®</sup> LE Agarose	Lonza Group Ltd (Basel, Schweiz)
Silver Enhancement System (R-Gent )	BioTrend (Köln, BRD)
SuperFrost <sup>®</sup> Plus	Menzel-Gläser (Braunschweig, BRD)
SYBR <sup>®</sup> Green I	Invitrogen (Carlsbad, CA)
TRIZOL <sup>®</sup> Reagent	Invitrogen (Carlsbad, CA)
Triton X-100	Sigma Chemie GmbH (München, BRD)
Trypsin	Sigma Chemie GmbH (München, BRD)
Vectashield <sup>®</sup> Mounting Medium	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Vectastain <sup>®</sup> Elite ABC Kit	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Ziegenserum	Rockland Inc. (Gilbertsville, PA, USA)
Zitrat	Fluka (München, BRD)

### **2.1.2. Geräte**

Algesimeter	Ugo Basile (Comerio, Italy)
Axioplan 2	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena, BRD)
CCD Video Camera	Horn IMAGING (Aalen, BRD)
Dynamisches Plantares Ästhesiometer	Ugo Basile (Comerio, Italy)
Incapacitance-Tester	Lincoln Instrumentation (Norfolk, UK)
Multimage <sup>™</sup> Light Cabine	Alpha Innotech Corporation (San Leandro, USA)
Oditest-Schnelltaster	Mitutoyo (Neuss, BRD)
Thermocycler MyIQ Single-Color real-time detection system	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Ultrospec100 UV/ Visible Spectrophotometer	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)

### **2.1.3. Computerprogramme, Internetprogramme und Internetseiten**

Chemilmager 4000; 3.3.b Alpha Imager™ 2000 Documentation & Analysis System	Alpha Innotech Corporation San Leandro, CA USA)
Primer3 (v. 0.4.0)-software	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi">http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/ primer3.cgi</a>
geNorm_win_3.5-Software	<a href="http://medgen.ugent.be/genorm/">http://medgen.ugent.be/genorm/</a>
KS 300.3.0 (Mikroskopsoftware)	Carl-Zeiss Jena GmbH (Jena, BRD)
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Optical System Software Version 1.0	Bio-Rad (Hercules, USA)

### **2.1.4. Antikörper**

**Tabelle 1: verwendete primäre Antikörper:**

Name	Antigen	Wirt	Antikörper	Firma
Anti-TNFR1 (H-271)	Extracelluläre humane TNFR1 Domäne, AS 30-301	Kaninchen	IgG Fraktion, polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, Ca., USA)
Anti-TNFR1 (H-5)	Extracelluläre humane TNFR1 Domäne, AS 30-301	Maus	IgG <sub>2b</sub> Fraktion, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, Ca., USA)
Anti-TNFR2	c-Terminus von Maus TNFR2	Kaninchen	keine Angabe	Lab Vision Cooperation (Fremont, Ca. USA)
Anti-ratVR1 (Anti-TRPV1)	c-terminales 15 AS langes Peptid des Ratten TRPV1	Kaninchen	IgG Fraktion, polyclonal	Alpha Diagnostics International Inc. (San Antonio, TX)
Anti-TNF- $\alpha$	rekombinates Ratten TNF- $\alpha$	Ziege	IgG Fraktion, polyclonal	R&D Systems, Minneapolis, USA

**Tabelle 2: verwendete sekundäre Antikörper:**

Name	Antigen	Wirt	Antikörpererkennung	Firma
Goat-Anti-Rabbit, Gold konjugiert – GAR-Gold	Kaninchenserum	Ziege	alle Immunoglobuline aus dem Kaninchen	Dako, (Hamburg, BRD)
Goat Anti-Rabbit, Cy3 konjugiert – GAR-Cy3	Kaninchenserum	Ziege	Schwere Kette des Kaninchen IgG sowie leichte Ketten fast aller Kaninchenimmunoglobuline	Jackson Immuno Research Europe Ltd. (Newmarket, UK)
Goat-Anti-Mouse, Cy2 konjugiert – GAR-Cy2	Mausserum	Ziege	Schwere Kette des Maus IgG sowie leichte Ketten fast aller Mausimmunoglobuline	Jackson Immuno Research Europe Ltd. (Newmarket, UK)
Goat Anti-Rabbit, biotinyliert – GAR-bio	Kaninchenserum	Ziege	alle Immunoglobuline aus dem Kaninchen	Dako (Hamburg, BRD)

### 2.1.5. Oligonukleotide

Die Oligonucleotide wurden von der Firma JenaBioscience GmbH (Jena, BRD) bezogen. Die mRNA-Sequenzen der entsprechenden Gene wurden aus der NCBI-Internetdatenbank ausgewählt. Die Primersequenzen wurden mit Hilfe des Primer3-Internetprogramms ausgewählt. An die Primer in Tabelle 3 wurden folgende Bedingungen gestellt: maximale Primerlänge 25 Basenpaare (bp), Schmelztemperatur der Primer zwischen 60-64°C, Fragmentlänge der PCR-Produkte maximal 250 Basen. Für die PCR wurde der entsprechende Vorwärtsprimer (vor) und Rückwärtsprimer (rück) 1:1 gemischt.

**Tabelle 3: verwendete Primersequenzen**

Gencode + Akzessionsnummer	Primernamen	Primersequenzen	Schmelztemperatur	PCR-Produktlänge
β-Actin NM_031144	Actin vor	CATTGCTGACAGGATGCAGA	60,99°C	
	Actin rück	AGCCACCAATCCACACAGAG	61,13°C	107 bp
IL-1β NM_031512	IL-1β vor 4	CCAACTGGTACATCAGCACCTC	61,88°C	
	IL-1β rück 4	CTAGCATGTCCTGGGGAAGG	61,92°C	150 bp
IL1-R1 NM_013123	IL1-R1 vor 3	GGTGATGAATGTGGCTGAAGAG	61,97°C	
	IL1-R1 rück 3	CTCATTCCTGGGCTCATAATC	62,90°C	157 bp
TNF-α NM_012675	TNF-α vor 3	GCGTGTTTCATCCGTTCTCTACC	63,15°C	
	TNF-α rück 3	CGTGTGTTTCTGAGCATCGTAG	60,88°C	183 bp
TNFR1 BC086413	TNFR1 vor	CCAGGAGAGGTGATTGTGGA	61,07°C	
	TNFR1 rück	ACTGAGGAGGCCCTGAGAAG	60,92°C	93 bp
TNFR2 NM_130426	TNFR2 vor	AGCCTGTGGATGCTGAAGAA	60,94°C	
	TNFR2 rück	CCAGAGGTCAGCACTCGAAC	61,01°C	221 bp
Ubiquitin c (Ubc) NM_017314	Ubc vor	CCAAGAAGGTCAAACAGGAAGATAC	61,51°C	
	Ubc rück	GGAAAACTAAGACACCTCCCCATC	63,28°C	108 bp

### 2.1.6. Medien

#### **10 x PBS-Puffer, pH 7,4**

1,4 mol/l NaCl  
27 mmol/l KCl  
15 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
81 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### **20 x TAE-Puffer, pH 8,3**

800 mmol/l Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  
400 mmol/l Eisessig  
20 mmol/l Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)



**10 x MOPS Puffer, pH 6,5-7,0**

200 mmol/l 3-[N-Morpholino]-  
Propansulfonsäure (MOPS)  
50 mmol/l Natriumacetat  
10 mmol/l EDTA

**Denaturierungslösung**

5 x Formaldehyd (37%)  
4,5 x 10x MOPS-Puffer  
17 x Formamid  
0,25 x Ethidiumbromid (10 mg/ml)

**2.1.7. Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden hauptsächlich Ratten verwendet. Die Ratten vom Wistar-Stamm (Crl:Wi; Stammkodierung 003) sind ausgezüchtete Albinoratten der Gemeinen Wanderratte (*Rattus norvegicus*), die ursprünglich am Wistar-Institut in Philadelphia, USA gezüchtet wurden. Sie wurden am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität gehalten. Lewisratten (Lew/Crl; MHC HAPLOTYPE RT11) wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, BRD) bezogen. Es handelt sich um einen Inzuchtstamm der Wistarratte, der sich besonders für Entzündungsmodelle eignet. Die erworbenen Tiere wurden für die Auslösung einer Antigen-induzierten Arthritis (AIA) verwendet.

Zusätzlich wurden auch erwachsene Mäuse vom CB57BL/6-Stamm verwendet, die von der Hausmaus (*Mus musculus* L.) abstammen. Die Wildtypmäuse des CB57BL/6-Inzuchtstammes sind genetisch und phänotypisch uniform, da sie durch Kreuzung der Nachkommen von weniger als 20 aufeinander folgenden Generationen gezüchtet wurden. Zusätzlich wurden basierend auf diesem genetischen Hintergrund TNF-Rezeptor *knockout*-Mäuse verwendet [*tnfr1*<sup>-/-</sup> (Rothe et al. 1993) und *tnfr2*<sup>-/-</sup> (Erickson et al. 1994)]. Die Mäuse wurden im Institut für Versuchstierkunde (Universitätsklinikum Jena) durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen von C57/BL/6-Mäusen erzeugt.

**2.2. Immunhistochemische Methoden****2.2.1. Auslösung einer Antigen-induzierten Arthritis für real-time PCR-Experimente und histochemische Markierungen**

Zur Auslösung einer Antigen-induzierten Arthritis (AIA) wurden 6-8 Wochen alte weibliche Lewisratten verwendet. Die Tiere wurden zunächst immunisiert, dazu wurde 500 µg m-BSA als Antigen in die Ratte subkutan appliziert. Methyliertes BSA wurde in 500 µl salzhaltigen *complete Freund's adjuvant* (CFA), angereichert mit inaktivierten 2 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (Stamm H37R1; Difco, Detroit, USA), emulgiert. Nach 7 Tagen erfolgte eine erneute Immunisierung. Nach weiteren 14 Tagen wurde das Antigen (m-BSA, 500 µg in 50 µl

Salzlösung) in den Gelenkspalt des linken Knies der Ratte injiziert und somit eine einseitige Entzündung ausgelöst. Gewebeentnahmen aus der linken Körperhälfte des Tieres werden hier als ipsilateral, aus der gegenüberliegenden Seite als kontralateral bezeichnet. Je nach Fragestellung wurden die Tiere nach 6-8 h, 1 Tag, 3 Tagen, 7 Tagen oder 21 Tagen nach der Auslösung der AIA getötet. Ein Teil der Tiere wurde nur immunisiert ohne eine AIA auszulösen; diese Kontrollgruppe wurde mit Tag 0 bezeichnet.

Für die *real-time* PCR-Experimente wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet und wie unter 2.2.2. beschrieben präpariert.

Für histochemische Markierungen wurden die Ratten zunächst mit 120 mg/kg Natriumthiopenton (Trapanal) intraperitoneal anästhesiert und anschließend intrakardial mit einer heparinhaltigen Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) und anschließend mit einer 4%igen Formalin-PBS-Lösung perfundiert. Dadurch wurden die Gewebe vor der Entnahme bereits teilweise fixiert. Die Präparation der Tiere wird im Abschnitt 2.2.2 beschrieben.

### **2.2.2. Präparation von Lewisratten für die Entnahme der lumbalen Ganglien L1-L5**

Nach dem Töten der Tiere (siehe 2.2.1.) wurde die fixierte Wirbelsäule entnommen. Der dorsale Teil der Wirbelsäule wurde abgetragen und das Rückenmark wurde entnommen. Auf der ventralen Seite sah man in den *Foramina vertebralia* die Spinalganglien liegen. Die Lumbalganglien L1 – L5 wurden getrennt nach ipsilateral (links) und kontralateral (rechts) entnommen. Für immnunhistochemische Markierungen wurden auch aus gesunden nicht-immunisierten Ratten Lumbalganglien getrennt nach links und rechts entnommen. Für die Immunhistochemie wurden diese Ganglien in 4%iger formaldehydhaltiger PBS-Lösung bei 4°C bis zur Einbettung mindestens 48 h fixiert und aufbewahrt.

Für die PCR-Experimente wurden die Ganglien nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

### **2.2.3. Präparation von Wistarratten und CB57BL/6-Mäuse für die Entnahme von Spinalganglien**

Für die Herstellung von Paraffinschnitten aus Spinalganglien wurden ca. 60 Tage alte männliche Ratten (*Wistar*) oder erwachsene CB57BL/6-Mäuse mit CO<sub>2</sub> getötet. Nach Entfernen des Fells über der Wirbelsäule wurde diese entnommen und zunächst in PBS (Phosphate-buffered-Saline) gelegt. Das *Foramen vertebrale* der Wirbelsäule wurde dorsal und ventral

aufgeschnitten und die beiden offenen Seiten in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) gelegt. Das Rückenmark wurde entfernt und bis zu 40 Spinalganglien aller Ebenen der Wirbelsäule wurden entnommen. Die Ganglien wurden in DMEM gelegt. Für die Einbettung der Ganglien in Paraffin (siehe 2.2.4.) wurden die Vorder- und Hinterwurzeln lediglich grob entfernt und die Ganglien in 4%iger formaldehydhaltiger PBS-Lösung bei 4°C mindestens 48 h fixiert.

#### **2.2.4. Herstellung von Paraffinschnitten aus Spinalganglien der Ratte und der Maus**

Die Ganglien wurden für die Einbettung in Paraffin in Netze (*Cellsafe Biopsy Capsule*) gelegt. Zunächst wurden die Ganglien über Nacht gewässert und danach in aufsteigender Ethanolreihe entwässert. Ethanol wurde schließlich über Nacht gegen 100%iges Methylbenzoat ausgetauscht. Die Ganglien in den Netzen wurden ca. 1½ h in 60°C heißes geschmolzenes Paraffin (Histosec) gelegt, danach aus den Netzen in eine Metallform gedrückt, die mit Paraffin aufgegossen wurde. Nach dem Aushärten des Paraffinblockes wurde dieser gestürzt und konnte anschließend mit einem Schlitten-Mikrotom geschnitten werden. Mit einem 18° Winkelmesser wurden 5-7 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf einen Wassertropfen der *SuperFrost® Plus* Objektträger übertragen. Auf einer 37°C warmen Streckplatte wurden durch Verdunstung des Tropfens die Paraffinschnitte gestreckt und hafteten schließlich an der Glasoberfläche des Objektträgers fest. Ein Objektträger wurde mit 8 Schnitten belegt, wobei aufeinanderfolgende Schnitte immer in der gleichen Reihenfolge auf den Objektträgern platziert wurden.

#### **2.2.5. TNFR1-Rezeptormarkierung und IB4-Markierung in Spinalganglienschnitten der Wistarratte**

Bei der Antikörpermarkierung von eingebetteten Paraffinschnitten wurde das Paraffin entfernt, da dieses die Markierung behindert. Zunächst wurden die Schnitte zweimal 10 min in Xylol gelegt und danach zweimal 10 min in 100%igen Ethanol. Anschließend wurde Ethanol in absteigender Alkoholreihe gegen Wasser ausgetauscht. Durch die Aufbewahrung der Ganglien in einer formaldehydhaltigen PBS-Lösung (siehe 2.2.3.) kommt es zu einer Aldehydvernetzung im Präparat, dadurch kann auch die dreidimensionale Struktur eines Proteins verändert werden. Man spricht auch von einer so genannten Antigenmaskierung, da Antikörper

entsprechende Antigene nicht mehr erkennen können. Durch 15-minütige Autoklavierung der Objektträger bei 120°C in 0,1 mol/l Zitratpuffer (pH 6) wurden die Antigene demaskiert. Nach dem Abkühlen wurden die Objektträger mit den Schnitten in PBS gewaschen. Um Bindungen der Antikörper an unspezifischen Bindungsstellen und somit unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden, musste geblockt werden. Zunächst wurden freie Aldehydgruppen durch eine halbstündige Inkubation mit 50 mmol/l Glycin, gelöst in 0,3% Triton X-100 in PBS (PBS 0,3% TX-100), geblockt. Um hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen der Antikörper mit dem Präparat entgegen zu wirken erfolgte eine halbstündige Inkubation mit 2% Fischgelatine in PBS 0,3% TX-100 und danach mit 2% Ziegen Serum in PBS 0,3% TX-100, da der 2. Antikörper aus der Ziege stammte. In der Ziegen Serumslösung wurde der 1. Antikörper Anti-TNFR1 (H-271) 1:200 verdünnt, auf den Schnitten verteilt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden nicht gebundene Antikörper durch Spülen mit PBS abgewaschen. Der 2. Antikörper mit 10 nm Gold konjugierter *goat anti-rabbit* Antikörper (GAR-Gold) wurde in Ziegen Serumslösung 1:100 verdünnt, auf den Schnitten verteilt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Die Plättchen wurden abermals mit PBS und anschließend 5-mal mit zweimal deionisiertem Wasser gewaschen. Im nächsten Schritt wurde durch die Reduzierung von Silberionen (Silberacetat) am Goldpartikel, der als Kristallisationspunkt diente, das Signal des 2. Antikörpers verstärkt. Dazu wurde die Verstärker- und Entwicklerlösung des *Aurion Conventional Gold Reagent* nach Herstellerangaben gemischt und die Mischung ca. 20 min auf den Schnitten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschen der Plättchen mit Wasser gestoppt. Im letzten Schritt wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit dem Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-gekoppelten Isolectin B4 (IB4-FITC) der Leguminose *Griffonia simplicifolia* inkubiert. IB4-FITC wurde 1:10 in Ziegen Serumslösung verdünnt, auf den Schnitten verteilt und über Nacht bei 4°C in einer dunklen feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit PBS gewaschen und die Schnitte in *Vectashield® Mounting Medium* eingebettet. Die Objektträger wurden dunkel bei 4°C bis zur Auswertung aufbewahrt, wobei das verwendete Einbettmedium das schnelle Ausbleichen des Fluorochroms verhinderte.

### **2.2.6. Auswertung der TNFR1/IB4-Doppelmarkierung**

Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2, dazugehöriger Software KS 300.3.0 und integrierter digitaler CCD Video Camera. Für die Durchlichtbetrachtung von

Objekten diente die Halogenleuchte HAL 100 als Lichtquelle. Für die Fluoreszenzanregung wurde die Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100 als Lichtquelle verwendet.

Bei der Auswertung von Spinalganglienschnitten wurden nur die Neurone der Spinalganglien jedes zweiten Schnittes bewertet, so dass die Doppelauszählung einer Zelle vermieden wurde. Außerdem wurden nur Neurone gezählt, bei denen der Zellkern zu sehen war. Von jedem zufällig ausgewählten Bildausschnitt wurden jeweils zwei Photos gemacht, ein Durchlicht-photo sowie ein Photo nach Fluoreszenzanregung. Es wurde insgesamt 400-fach vergrößert. Das Licht wurde durch einen grünen Filter geleitet, so dass Licht mit der Wellenlänge von 450-490 nm auf den Objektträger traf. Das Absorptionsmaximum des Fluochroms FITC liegt bei 495 nm und das Emmissionsmaximum bei 519 nm. Die so IB4-FITC-markierten Zellen wurden photographiert und die Bildsequenzen mit der Software KS 300.3.0 ausgewertet. Alle Neurone der Durchlichtphotos, deren Zellkern zu sehen war, wurden für die Auswertung markiert. Die Zellen wurden automatisch nummeriert sowie der Durchmesser, die Fläche und der Grauwert dieser Zellen gespeichert. Die Nummer der Zellen, die fluoreszierten, wurden notiert, um sie später als IB4-positive Zellen identifizieren zu können. Außerdem wurde der Grauwert des Hintergrundes bzw. des Objektträgers gemessen. Die gesammelten Daten der Neurone, Nummerierung, Durchmesser, Fläche sowie Grauwert wurde mit Microsoft Excel ausgewertet. Die mit einer Silberverstärkung markierten TNFR1-positiven Neurone wurden nun anhand des relativen Grauwertes identifiziert. Dazu wurde der Grauwert jeder Zelle durch den Grauwert des Hintergrundes dividiert. Dieser relative Grauwert wurde von 1 subtrahiert, deshalb bedeutet ein relativer Grauwert von 1, dass die Zelle schwarz und 0, dass die Zelle durchsichtig ist. Alle Werte dazwischen zeigen verschiedene Grautöne an. Es wurde für die Auswertung festgelegt, dass eine Zelle mit einem relativen Grauwert größer als 0,16 als TNFR1-positiv zu werten ist. Der Wert ergab sich aus mehreren Kontrollmarkierungen ohne Verwendung des 1. Antikörpers. Der größte relative Grauwert der Neurone, die bei Kontrollmarkierungen erreicht wurden, war 0,16. Schließlich wurde noch berechnet, wie viele Zellen unmarkiert, einfach TNFR1- oder IB4- markiert oder doppelt markiert waren.

### **2.2.7. TNFR1- und TRPV1-Rezeptor-Doppelmarkierung in Spinalganglienschnitten der Wistarratte**

Die Entfernung des Paraffins sowie die Demaskierung der Antigene wurde durchgeführt wie im Abschnitt 2.2.5. beschrieben. Um Hintergrundfärbungen zu minimieren, wurde zuerst 30 min mit 2% Fischgelatine in PBS 0,3% TX-100 und danach mit 2% Ziegen Serum in PBS

0,3% TX-100 geblockt. Zusätzlich wurde 3-mal eine Minute mit 0,1% Rinderserumalbumin in PBS 0,3% TX-100 geblockt. Der 1. Antikörper Anti-TNFR1 (H-5) Antikörper wurde 1:15 und Anti-TRPV1 1:50 zusammen in 2% Ziegenserum in PBS 0,3% TX-100 verdünnt und auf den Schnitten verteilt, über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend wurden nicht gebundene Antikörper mit PBS abgewaschen. Der mit dem Fluochrom Cy2 (grün fluoreszierenden Carbocyanin) gekoppelte 2. Antikörper *goat anti-mouse* (GAM-Cy2) wurde 1:25 verdünnt und erkennt Anti-TNRR1, da dieser in der Maus produziert wurde. Der mit Cy3 (rot fluoreszierende Carbocyanin) gekoppelte 2. Antikörper GAR-Cy3 wurde 1:300 verdünnt und erkennt Anti-TRPV1, der aus dem Kaninchen stammt. Beide Antikörper wurden zusammen in 2% Ziegenserumlösung verdünnt, die Mischung auf die Schnitte gegeben und über Nacht in einer dunklen feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Schnitte in *Vectashield<sup>®</sup> Mounting Medium* eingebettet und dunkel bei 4°C bis zur Auswertung aufbewahrt.

#### **2.2.8. Auswertung der TNFR1/TRPV1-Doppelmarkierung**

Wie in Abschnitt 2.2.6. geschrieben wurden die Ganglienschnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 und den erwähnten dazugehörigen Bestandteilen ausgewertet. Die Markierungen mit den fluoreszierenden 2. Antikörpern wurden 400-fach vergrößert. Es wurden zwei Photos nach Fluoreszenzanregung gemacht. Das grün fluoreszierende Cy2 der TNFR1-Markierung hat ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{\max} = 489 \text{ nm}$  und emittiert maximal bei  $\lambda_{\max} = 503 \text{ nm}$ . Der verwendete grüne Filter ließ Anregungslicht zwischen 450-490 nm durch. Die TRPV1-Markierung wurde mit dem rot fluoreszierenden Cy3 sichtbar gemacht. Cy3 hat sein Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{\max} = 549 \text{ nm}$  und das Emissionsmaximum bei  $\lambda_{\max} = 562 \text{ nm}$ . Der ausgewählte Filter lässt Strahlung eng begrenzt bei  $\lambda_{\max} = 546 \text{ nm}$  durch. Die Bildsequenzen wurden mit der Software KS 300.3.0 ausgewertet. Alle Neurone der TNFR1-Markierung, deren Zellkern zu sehen war, wurden für die Auswertung markiert. Die Zellen wurden automatisch nummeriert sowie der Durchmesser und die Fläche dieser Zellen gespeichert. Im Vergleich mit Photos der TRPV1-Markierung wurde notiert, welche Zellen, identifizierbar durch die Nummerierung, TRPV1-positiv waren. Es wurde danach berechnet wie viele Zellen unmarkiert, einfach TNFR1- oder TRPV1-markiert oder doppelt markiert waren. Außerdem wurde bei allen Zellen die Fläche in  $\mu\text{m}^2$  gemessen und die Zellen in verschiedene Größenkategorien eingeordnet. Die Zellen wurden in 100  $\mu\text{m}^2$ -Schritten von 0-3000  $\mu\text{m}^2$

gruppiert und gezählt. So konnte bestimmt werden, wie viele Prozente aller Neurone in einer Größenkategorie TNFR1-positiv sind (siehe 3.1.2).

### **2.2.9. TNFR1- und TNFR2-Rezeptormarkierung an Schnitten von Spinalganglien nach AIA in Lewisratten und CB57BL/6-Mäusen**

Für die TNFR1- oder TNFR2-Proteinrezeptorexpression wurden lumbale Spinalganglienschnitte von Normaltieren und Tieren der Tage 0, 1, 3, 7 und 21 nach AIA-Induktion verwendet. Wie im Abschnitt 2.2.5. beschrieben, wurden die Schnitte entparaffiniert und demaskiert. Es wurde 30 min mit 2% Ziegenserum in PBS 0,3% TX-100 und 3-mal eine Minute mit 0,1% Rinderserumalbumin in PBS 0,3% TX-100 geblockt. Für die TNFR1-Markierung wurde der anti-TNFR1 (H271) 1:200 und für die TNFR2-Markierung der Anti-TNFR2 1:1000 in PBS 1% Triton X100 + 1% Fischgelatine verdünnt, auf den Schnitten verteilt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und ein mit Biotin gekoppelter 2. Antikörper GAR-Antikörper (GAR-bio) in der gleichen Lösung wie der 1. Antikörper verdünnt und auf den Schnitten verteilt. Für die TNFR1-Markierung wurde GAR-bio 1:100 und für die TNFR2-Markierung GAR-bio 1:200 verdünnt. Der Antikörper wurde ca. 40 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und danach die Schnitte mit PBS gewaschen. Das am 2. Antikörper gebundene Biotin wurde durch Bindung des Glykoproteins Avidin verstärkt. Dazu wurde der Reagenziensatz *Vectastain® Elite ABC Kit* verwendet. Die Reagenzien A und B wurden abweichend vom Herstellerprotokoll 1:200 in PBS 1% Triton X100 + 1% Fischgelatine verdünnt, 1:1 gemischt und 30 min inkubiert. Dabei kam es zur Bildung von dreidimensionalen Komplexen durch die Bindung von biotinylierter Meerrettichperoxidase an Avidin. Die entstandenen Komplexe banden anschließend an den biotinylierten 2. Antikörper durch freie Bindungsstellen des Avidins. Die Mischung wurde auf die Schnitte pipettiert und 40 min inkubiert. Nicht gebundene Komplexe wurden danach mit PBS abgewaschen. Um die gebundenen Komplexe sichtbar zu machen, wurde durch die im Immunkomplex gebundene Peroxidase ein Chromogen mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert. Dazu wurde das *Jenchrom™ px blue Detection System* verwendet. Es kommt zu einer dunkelblauen Farbreaktion bzw. Niederschlag am Immunkomplex und somit zur Sichtbarmachung des 1. Antikörpers Anti-TNFR1 oder Anti-TNFR2. Der Peroxidaseassay wurde mit 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung gestartet, auf den Schnitten verteilt und ca. 35 min (TNFR1-Markierung) oder 20-25 min (TNFR2-Markierung) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Spülen mit Wasser gestoppt. Danach wurde das Wasser schrittweise in aufsteigender Ethanolreihe entfernt

und Ethanol danach durch Xylol ausgetauscht. Anschließend wurden die Schnitte in das Kunstharz Entellan dauerhaft eingebettet.

#### **2.2.10. Auswertung markierter TNFR1- oder TNFR2-Neurone von Spinalganglien der AIA-Studie und CB57BL/6-Mäusen**

Die entsprechenden Auswertekomponenten wurden bereits in Abschnitt 2.2.6. beschrieben. Von den Spinalganglienschnitten der TNFR1- oder TNFR2-Markierungen wurden von jedem zufällig ausgewählten Bildausschnitt jeweils ein Durchlichtphoto mit 200-facher Vergrößerung gemacht und mit der Software KS 300.3.0 ausgewertet. Die Peroxidasefärbung (siehe 2.2.9. und 2.2.10.) ist eine inkonsistente Verstärkermethode, deren Färbeverlauf stark Temperaturabhängig und abhängig von der Peroxidasecharge ist, so dass gleiche Reaktionszeiten durchaus zu unterschiedlichen Färbeergebnissen auf verschiedenen Präparaten führen können. Deshalb wurde von Präparat zu Präparat individuell entschieden, ob ein Neuron TNFR1- bzw. TNFR2-markiert war oder nicht. Alle markierten und nicht markierten Neurone eines Bildausschnittes, deren Zellkerne zu sehen waren, wurden gezählt. Es wurde individuell festgelegt, ob eine TNFR1- bzw. TNFR2-positive Markierung vorlag und der prozentuale Anteil markierter Zellen an den verschiedenen Versuchstagen berechnet. Die Bildsequenzen der Kontrolltiere wurden außerdem nach ihrer Größe ausgewertet wie unter 2.2.8. beschrieben. Die Zellen wurden in 100  $\mu\text{m}^2$ -Schritten von 0-3000  $\mu\text{m}^2$  gruppiert, gezählt und es wurde berechnet wie viele Prozente aller Neurone einer Größenkategorie TNFR1- oder TNFR2-positiv waren (siehe 3.1.1).

Die Ganglien der CB57BL/6-Mausschnitte und dessen *knockout*-Varianten dienten als Spezifitätskontrolle für die verwendeten Anti-TNFR1- und TNFR2-Antikörper. Dazu wurden Bilder mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen und lediglich das Vorkommen TNFR1- oder TNFR2-positiver Zellen registriert.

#### **2.2.11. TNF- $\alpha$ -Markierung an Schnitten von Spinalganglien nach AIA in Lewisratten**

Für die TNF- $\alpha$ -Proteinexpression wurden lumbale Spinalganglienschnitte von Normaltieren und von Tieren der Tage 0, 1, 3 und 21 nach AIA-Induktion verwendet. Entparaffinierung und Demaskierung wurden im Abschnitt 2.2.5. beschrieben. Es wurde 30 min mit 2% Ziegen Serum in PBS 0,3% TX-100 geblockt. Der 1. Antikörper gegen TNF- $\alpha$  wurde 1:50 in PBS plus 2% Ziegen Serum verdünnt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Über-



schüssiger Antikörper wurde am nächsten Tag mit PBS abgespült. Als 2. Antikörper wurde ein Cy3 gekoppelter GAR-Antikörper 1:50 in PBS plus 2% Ziegerserum verdünnt, auf den Schnitten verteilt und 4 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde mit PBS abgewaschen und die Schnitte wurden in *Vectashield® Mounting Medium* eingebettet. Bis zur Auswertung wurden die Schnitte dunkel bei 4°C aufbewahrt.

### **2.2.12. Auswertung markierter TNF- $\alpha$ -Neurone von Spinalganglien der AIA-Studie**

Wie in Abschnitt 2.2.6. geschrieben wurden die Ganglienschnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 und den erwähnten dazugehörigen Bestandteilen ausgewertet.

Das rot fluoreszierende Cy3-Fluochrom hat sein Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{\text{max}} = 549$  nm und das Emissionsmaximum bei  $\lambda_{\text{max}} = 562$  nm. Der ausgewählte Filter lässt Strahlung eng begrenzt bei  $\lambda_{\text{max}} = 546$  nm durch. Das 400-fach vergrößerte Präparat wurde nach Fluoreszenzanregung photographiert. Die Bildsequenzen wurden mit der Software KS 300.3.0 ausgewertet. Alle Neurone mit TNF- $\alpha$  Markierung eines Bildausschnittes, deren Zellkern zu sehen war, wurden gezählt und der prozentuale Anteil markierter Zellen wurde berechnet.

## **2.3. Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1. Gewinnung von Gesamt-RNA**

#### **1. RNA-Extraktion aus der Rattenleber**

Gesamt-RNA aus Lebergewebe wurde mit *TRIzol® Reagent* basierend auf der Guanidiniumthiocyanat-Methode von Chomczynski und Sacchi, (Chomczynski und Sacchi 1987) eluiert. Nach Angaben des Herstellers wurde das Gewebe homogenisiert und die RNA extrahiert. Bei der Extraktion konnten Kontaminationen mit genomischer DNA nicht ausgeschlossen werden. Um spätere Verfälschungen der Ergebnisse zu vermeiden, wurde vor der *reversen*-Transkription (siehe 2.3.3.) ein DNA-Verdauungsschritt durchgeführt. Ein typischer Verdauungsansatz sah wie folgt aus:

10 -15  $\mu\text{g}$  Nukleinsäure  
1  $\mu\text{l}$  Desoxyribonuklease, 1 *unit*/ $\mu\text{l}$  (U)  
10  $\mu\text{l}$  10 x Reaktionspuffer  
0,1  $\mu\text{l}$  *RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor* , 40 U/ $\mu\text{l}$   
auf 100  $\mu\text{l}$  *Aqua ad iniectabilia*

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und dann durch Hitzedenaturierung gestoppt. Der Verdauungsansatz wurde gereinigt, die RNA aufkonzentriert, getrocknet und in *Aqua ad iniectabilia* gelöst. Die Gesamt-RNA wurde bei -80°C gelagert. Die gereinigte Gesamt-RNA wurde qualitativ und quantitativ, wie im Abschnitt 2.3.2. beschrieben, überprüft. Für PCR-Versuche wurde der mRNA-Anteil der Gesamt-RNA wie in *Abschnitt 2.3.3. in complementary DNA (cDNA)* umgeschrieben.

## 2. RNA-Extraktion aus Spinalganglien von Ratten

Für die Präparation von Gesamt-RNA aus Spinalganglien wurde ein Reagenziensatz *RNeasy® Plus Mini Kit* verwendet. Der Reagenziensatz basiert ebenfalls auf der Guanidiniumthiocyanat-Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mit einem zusätzlichen DNA-Eliminierungsschritt um Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA zu vermeiden. Das bei -80°C tiefgefrorene Material wurde in einer Mischung aus Guanidiniumthiocyanat und β-Mercaptoethanol aufgenommen und homogenisiert. Die Eliminierung der DNA sowie die Eluierung der RNA aus dem Homogenisat erfolgten direkt auf Siliciumoxidsäulchen. Das Homogenisat wurde entsprechend der Gebrauchsanweisung weiter behandelt. Die Gesamt-RNA wurde bei -80°C bis zu deren Verwendung gelagert.

### 2.3.2. Bestimmung der Quantität und Qualität der Gesamt-RNA

#### 1. Quantitative RNA-Bestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte spektrometrisch bei 260 nm. Die Absorption der Nukleinsäuren wurde in einer Quarzküvette mit dem Spektrometer (Ultrospec 100 UV/Visible Spectrophotometer) gemessen. Die RNA-Proben wurden in 10 mmol/l TRIS-Puffer (pH 7,4) 1:70 verdünnt. Die Nukleinsäurekonzentration  $c$  in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  berechnet sich nach Gleichung 1 aus dem Produkt der optischen Dichte (OD), der Absorption ( $A_{260}$ ) der 1:70 verdünnten RNA-Lösung und dem Verdünnungsfaktor (V). Dabei gilt, dass einzelsträngige RNA bei einer Konzentration von 33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eine optische Dichte von 1 erreicht.

#### **Gleichung 1: Berechnung der RNA-Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$**

$$c = OD \times A_{260} \times V/1000 = 33 \mu\text{g}/\text{ml} \times A_{260} \times 70/1000$$

$c$  = RNA-Konzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

OD = Konzentration der RNA bei der optischen Dichte 1

V = Verdünnungsfaktor

Außerdem wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge wurde der Proteingehalt einer Lösung ermittelt. Aus dem Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  wurden Rückschlüsse auf die Reinheit der Nukleinsäurelösung gezogen. Eine „reine RNA-Lösung“ hatte einen Quotienten zwischen 1,8-2,1.

## 2. RNA-Qualitätsbestimmung

Aus dem Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  konnten bereits Hinweise auf eventuelle Verunreinigungen mit Enzymresten oder RNA-Degradierungen gezogen werden. Über die Qualität der Gesamt-RNA konnte eine Aussage mit Hilfe eines denaturierenden Agarosegels mit Formaldehyd gemacht werden. Zu 500 ng Gesamt-RNA einer Probe wurden eine Denaturierungslösung (siehe 2.1.6) gegeben. Die Proben wurden 10 min auf 65°C erhitzt und dadurch sekundäre und höhere Konformationsstrukturen der RNA aufgeschmolzen. Anschließend wurden die Proben unmittelbar auf Eis gestellt, so dass die linearen Strukturen der RNA-Moleküle erhalten blieben. Die Auftrennung der RNA ist im Abschnitt 2.3.3. Nr. 2 beschrieben.

### 2.3.3. Gelelektrophorese

#### 1. Agarose-Gele für DNA

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 80 und 200 bp wurde mit einer 3%igen Agarosekonzentration gearbeitet. Dazu wurde Seakem<sup>®</sup> LE Agarose in 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) geschmolzen, Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,25 µg/ml) zugegeben, die Agarose in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren wurden die PCR-Produkte plus Gelbeladungspuffer und ein Längenstandard (*O'Gene Ruler<sup>TM</sup> DNA Ladder, Low Range*) aufgetragen. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in 1 x TAE-Puffer (siehe 2.1.6.) aufgetrennt. In die doppelsträngige DNA interkaliert während der Größenauftrennung das im Gel befindliche Ethidiumbromid. Im UV-Licht (595 nm) der *Multimage<sup>TM</sup> Light Cabine* wurde die DNA sichtbar. Bilder für die Dokumentation wurden mit der dazugehörigen Software *Chemilmager 4000; 3.3.b* des *Alpha Imager<sup>TM</sup> 2000 Documentation & Analysis System* gespeichert.

#### 2. Denaturierendes Agarosegel für die RNA-Auftrennung

Für ein 1,5%iges denaturierendes Agarosegel wurde 1,87 mg Seakem<sup>®</sup> LE Agarose in 92,5 ml deionisiertem Wasser + 12,5 ml 10 x MOPS-Puffer in der Mikrowelle geschmolzen und anschließend 20 ml 37%iges Formaldehyd hinzugegeben und das Gel gegossen. Nach dem Er-

starren des Gels wurde als Laufpuffer ca. 900 ml 1 x MOPS-Puffer hinzugegeben und die denaturierten Proben aufgetragen, siehe Abschnitt 2.3.2. Nr. 2. Die RNA wurde 2 h bei ca. 90 V aufgetrennt. War die RNA nicht degradiert, sah man nach der Auftrennung der Proben im UV-Licht des *Multimage<sup>TM</sup> Light Cabine* zwei scharfe ribosomale Banden (28S- und 18S-Bande), die in allen Proben gleiche Intensität haben sollten.

#### **2.3.4. Reverse Transkriptase-PCR**

Bei der *Reverse Transkriptase-PCR* (RT-PCR) werden mRNA-Matrizen in cDNA-Matrizen umgeschrieben. Es wurde das *RevertAid<sup>TM</sup> H First Strand cDNA Synthesis Kit* verwendet. Die verwendete *H Moloney-Murine-Leukemia Virus Reverse Transcriptase* ist eine gentechnisch veränderte Transkriptase mit geringer RNase H-Aktivität, d.h. die Verdauung der RNA von DNA/RNA-Hybriden ist reduziert. Die einzelnen Proben wurden gemäß des Herstellerprotokolls (*Synthesis of First Strand cDNA Suitable for PCR Amplification*) pipettiert. Es wurde der Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer verwendet um spezifisch alle mRNA-Matrizen in cDNA zu übersetzen. Der Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer bindet an den 3'-Polyadenylatschwanz und bildet den Startpunkt für Synthese des komplementären DNA-Stranges. Bei der cDNA-Synthese aus mRNA von Spinalganglien wurden 1–1,5 µg Gesamt-RNA für die Transkription verwendet. Die Proben wurden anschließend mit *Aqua ad iniectabilia* verdünnt, so dass bezogen auf die Ausgangskonzentration der Gesamt-RNA die Konzentration in den Proben 15 ng/µl betrug. Für die cDNA-Synthese aus Leber-RNA wurden größere Mengen an Gesamt-RNA eingesetzt. Für die individuellen Ansprüche verschiedener PCR-Versuche wurde die cDNA entsprechend verdünnt.

#### **2.3.5. Real-time PCR-Experimente**

Die *real-time* PCR ist ein PCR-Verfahren, bei der die PCR-Produktmenge in Echtzeit beobachtet werden kann. Dazu wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I in den PCR-Ansatz gegeben. SYBR Green I interkaliert in dsDNA und emittiert bei  $\lambda_{\text{max}} = 521$  nm nach Anregung bei  $\lambda_{\text{max}} = 494$  nm. Mit steigender Produktkonzentration werden stärkere Fluoreszenzen gemessen. Für die Quantifizierung von Proben wird der so genannte *threshold-cycle* (Ct-Wert) definiert, der den PCR-Zyklus anzeigt, bei dem eine Schwellenfluoreszenz überschritten wurde. Die Schwellenfluoreszenz wurde in der exponentiellen Phase der PCR gewählt, also zu dem Zeitpunkt, bei dem jeder Zyklus eine Verdopplung der PCR-Produkte bedeutet.

Die Schwellenfluoreszenz bei der PCR eines Gens wurde zu allen Messzeitpunkten gleich gewählt. Die PCR setzt sich aus drei Schritten zusammen:

1. Denaturierung der cDNA (bzw. der Amplifikate)
2. komplementäres Binden der Primer an die DNA
3. Synthese des zweiten Stranges (*elongation*)

Die Schritte wurden 35 bis 40-mal wiederholt. Bei den durchgeführten Versuchen sollte mit Hilfe der *real-time* PCR die Regulierung verschiedener Gene auf der Transkriptionsebene im Verlauf einer AIA untersucht werden. Die Änderungen der Transkription der Gene für TNF- $\alpha$ , TNFR1, TNFR2, IL-1 $\beta$ , IL1-RI sowie  $\beta$ -Actin und Ubiquitin c (Ubc) wurden zu den Zeitpunkten 6-8 h, Tag 1, Tag 3 und Tag 21 nach Auslösung der AIA gemessen. Die Änderung des Expressionsniveaus des jeweiligen Gens wurde auf immunisierte Tiere (Tag 0) bezogen. Für die PCR wurde die *Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase* verwendet. Diese Polymerase ist eine mit einem Antikörper blockierte Taq-Polymerase, die erst nach Hitzeaktivierung des Antikörpers enzymatisch aktiv ist. Ein PCR-Ansatz der Proben-cDNA aus Spinalganglien sowie für die Erstellung der Standardkurve mit Leber-cDNA (2.3.7.) sah wie folgt aus:

2,5	$\mu$ l	10x PCR-Puffer
0,2	mmol/l	Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTP)
10	nmol/l	Fluorescein
1,5	mmol/l	MgCl <sub>2</sub> ,
4	$\mu$ l	SYBR Green I (1/10000 verdünnt)
0,5	pmol/ $\mu$ l	Primer-Mix (Tabelle 3)
2	$\mu$ l	cDNA
1	U/ 50 $\mu$ l	Ansatz Platinum <sup>®</sup> Taq DNA Polymerase
x	$\mu$ l	<i>Aqua ad iniectabili</i> auf 25 $\mu$ l Reaktionsvolumen

Für die PCR mehrerer Proben wurde ein Mastermix pipettiert. Jede Probe wurde pro Gen und Durchgang im Triplet mitgeführt. Die PCR wurde mit dem Thermocycler *MyIQ Single-Color real-time detection system* durchgeführt. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit der integrierten *Optical System Software Version 1.0*. Die Schmelztemperatur des Primers sowie die Länge der Amplifikate (siehe Tabelle 3) wurden so gewählt, dass die PCR-Bedingungen im Thermocycler gleich gewählt werden konnten. Die Schritte 1-4 zeigen das optimierte PCR-Programm.

**Schritt 1:** 7 min    95°C    Denaturierung der cDNA und Aktivierung der Taq-Polymerase

**Schritt 2:** 30 s    95°C    Denaturierung der cDNA bzw. Amplifikate

**Schritt 3:** 20 s      62°C      Binden der Primer (60°C bei  $\beta$ -Actin)

**Schritt 4:** 30 s      72°C      Strangsynthese und Messung der Fluoreszenz

Die Schritte 2-4 wurden 40-mal wiederholt. Die Qualität der synthetisierten Amplifikate wurde durch die Bestimmung der Schmelztemperatur kontrolliert. Nach der PCR wurde eine Schmelztemperaturkurve aufgenommen.

**Schritt 1:** 1 min      95°C      Denaturierung der Amplifikate

**Schritt 2:** 1 min      55°C      Hybridisierung der Amplifikate

**Schritt 3:** 10 s      Temperaturrampe 55°C - 95°C; 0,5°C-Schritte

Die Fluoreszenz wurde bei jeder Änderung der Temperatur in Schritt 3 gemessen. Schmelzen bzw. lösen sich die doppelsträngigen Amplifikate voneinander, lässt die Stärke der Fluoreszenz nach, da SYBR Green I nur in Doppelstränge interkaliert und fluoresziert. Die Temperatur, bei der keine Fluoreszenz mehr gemessen wurde, ist spezifisch für jedes PCR-Produkt, d.h. abhängig von Länge des Produktes und seiner Basensequenz. Die Schmelztemperaturbestimmung diente als Kontrolle für Nebenprodukte, die bei der PCR entstehen können, wie z. B. Primerdimerisierungen oder auch Nebenprodukte durch Verunreinigungen mit genomischer DNA. Zusätzlich wurde die Qualität der PCR-Produkte noch durch eine elektrophoretische Auftrennung überprüft (siehe 2.3.3.1.)

### **2.3.6. Berechnung der Expressionsänderung und Normalisierung der *real-time* PCR**

Die Ct-Werte der Gene für TNF $\alpha$ , TNFR1, TNFR2, IL-1 $\beta$  und IL1-R1 wurden zu den Zeitpunkten 6-8 h, Tag 1, Tag 3 und Tag 21 nach Auslösung der AIA sowie an Tag 0 gemessen. Dabei wurde die Schwellenfluoreszenz des jeweiligen Gens immer gleich gesetzt. Die relative Expressionsänderung wurde nach dem mathematischen Modell von Pfaffl (2001) mit Gleichung 2 berechnet.

#### **Gleichung 2: Berechnung der relativen Expressionsänderung**

$$\text{Relative Expressionsänderung} = E^{\Delta Ct}; \Delta Ct = \overline{Ct}_{\text{Tag 0}} - Ct_{\text{AIA-Probe}}$$

$E$  = PCR-Effizienz  
 $Ct$  = threshold cycle  
 $\overline{Ct}$  = mittlere Ct-Wert am Tag 0

In Gleichung 2 ist E die Effizienz der PCR eines Gens und Ct-Wert, der Wert, der den PCR-Zyklus, der angibt bei dem die Schwellenfluoreszenz überschritten wurde. Die Änderung des Ct-Wertes  $\Delta Ct$  eines Gens zu einem Zeitpunkt wird berechnet aus den mittleren Ct-Werten der immunisierten Tiere am Tag 0 minus dem Ct-Wert der AIA-Probe zu diesem Zeitpunkt. Die relative Expressionsänderung ergibt sich aus der Potenzierung des  $\Delta Ct$  mit der Effizienz der PCR-Reaktion. Die Effizienz der PCR beträgt bei Idealbedingungen 2, d.h. jeder PCR-Zyklus führt zur Verdopplung der Amplifikate. Die Berechnung der Effizienz wird in Abschnitt 2.3.7. beschrieben.

Die Ergebnisse der relativen Expression der Zielgene TNF- $\alpha$ , TNFR1, TNFR2, IL-1 $\beta$  und IL1-R1 wurden auf einen sog. Normalisierungsfaktor (NF) bezogen. Dazu wurde aus den relativen Expressionsänderungen der Haushaltsgene  $\beta$ -Actin und Ubiquitin c (Ubc) der NF, wie unter 2.3.8. beschrieben, berechnet. Die Haushaltsgene wurden unter der Annahme ausgewählt, dass bestimmte Gene konstitutiv gleich bleibend, unabhängig vom pathophysiologischen Zustand des Tieres, exprimiert werden. Für diese Studie wurden  $\beta$ -Actin, ein Protein des Zytoskeletts, und Ubiquitin c (Ubc), ein Enzym der Atmungskette, ausgewählt. Eine konstante Expression der Gene darf eher als Modellvorstellung verstanden werden. Mit der Normierung auf den NF soll vor allem die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert werden. Damit konnten inhärente Variabilitäten der RNA, Unterschiede bei der Aufbereitung der einzelnen Proben und Unterschiede der *reversen*-Transkription rechnerisch ausgeglichen werden. Die relative Expressionsänderung des Zielgens zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde letztlich durch den Normalisierungsfaktor zu diesem Zeitpunkt geteilt, siehe Gleichung 3.

### Gleichung 3: Normierung der relativen Expressionsänderung

$$\text{normierte relative Expressionsänderung des Zielgens} = \frac{\text{Relative Expressionsänderung des Zielgens}}{\text{Normalisierungsfaktor}}$$

### 2.3.7. Bestimmung der PCR-Effizienz

Für die Auswertung nach Pfaffl (2001) (siehe Gleichung 2) musste die PCR-Effizienz E (Gleichung 4) für jedes Gen bestimmt werden. Theoretisch kommt es zu einer Verdoppelung der Amplifikate pro PCR-Zyklus, das entspricht einer Effizienz von 2 also 100%. Die Effizienz ist vor allem vom Binden der Primer abhängig. Die PCR-Effizienzen der untersuchten Gene sind in Tabelle 4 aufgeführt. Für die Berechnung der Effizienz wurde cDNA, die aus mRNA der Leber (siehe 2.3.1) hergestellt wurde, in mehreren Schritten verdünnt. Die Kon-

zentrationen der Standardkurve beziehen sich auf die Gesamt-RNA. Folgende Verdünnungen wurden verwendet: 100, 50, 10, 5, 1, 0,1, 0,01 ng. Jede Verdünnung wurde dreimal bei der Amplifikation mitgeführt. Der PCR-Ansatz für eine Probe sowie das Thermocycler-Programm ist in Abschnitt 2.2.5. beschrieben.

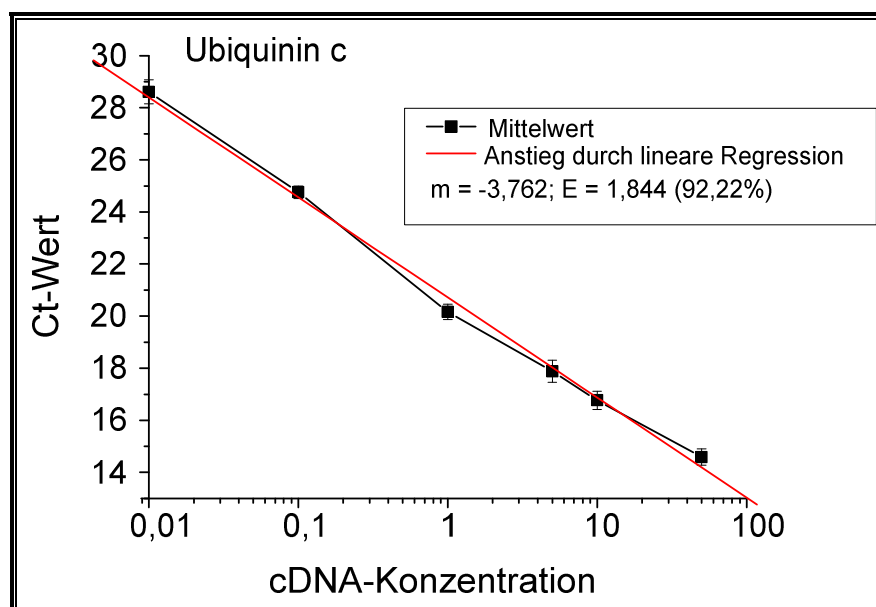
**Tabelle 4: Ermittelte PCR-Effizienzen**

Gen	PCR-Effizienz
$\beta$ -Actin	2
IL-1 $\beta$	2
IL1-R	1,85
TNF $\alpha$	2
TNFR1	2
TNFR2	1,87
Ubc	1,84

**Gleichung 4: Berechnung der PCR-Effizienz**

$$E = 10^{-1/m} \quad m = \text{negativer Anstieg der Geraden}$$

In einer halblogarithmischen Graphik wurden die cDNA-Verdünnungen gegen den mittleren Ct-Wert aufgetragen. Durch lineare Regression wurde eine Gerade durch die Messpunkte gelegt und der Anstieg der Geraden bestimmt. In Abbildung 2.1 wurde am Beispiel von Ubc der negative Anstieg m der Gerade und dann nach Gleichung 4 die Effizienz E berechnet.



**Abb. 2.1: Lineare Regression zur Bestimmung der PCR-Effizienz von Ubc.** Die cDNA-Konzentration wurde im dekadischen Logarithmus gegen den Ct-Mittelwert dreier Messungen aufgetragen. Durch lineare Regression konnte der Anstieg m der linearen Abhängigkeit log cDNA-Konzentration zu Ct bestimmt werden.



Für die PCR-Effizienz wurde die *real time*-PCR dreimal wiederholt und die Effizienzen der drei Messungen gemittelt. Wurde eine theoretische rechnerische Effizienz von über 2 ermittelt, wurde für die Berechnung der relativen Expressionsänderung (Gleichung 2) automatisch 2 eingesetzt, da mehr als eine Verdopplung der PCR-Produkte pro Zyklus nicht möglich ist

### **2.3.8. Berechnung des Normalisierungsfaktors**

Der Normalisierungsfaktor (NF) wurde mit der *geNorm\_win\_3.5-Software*, einer frei verfügbaren Internet-*software*, aus den beiden Haushaltsgenen  $\beta$ -Actin und Ubc berechnet. Die Berechnung und Wahl der entsprechenden Haushaltsgene basiert auf der Veröffentlichung von Vandesompele et al. (2002). Der NF jedes einzelnen Tiers wurde zunächst nach Gleichung 5 berechnet, wobei die größte relative Expressionsänderung aller Werte von Ubc und  $\beta$ -Actin jeweils durch 1 ersetzt wurde. Die Expressionsänderung der ipsilateralen und der kontralateralen Seite wurden dabei getrennt betrachtet.

#### **Gleichung 5: Berechnung des Normalisierungsfaktors eines einzelnen Tieres**

$$NF_{\text{Tier}} = \sqrt{\text{Relative Expressionsänderung Ubc} \times \text{Relative Expressionsänderung } \beta\text{-Actin}}$$

NF = Normalisierungsfaktor

Danach wurde das geometrische Mittel, getrennt nach ipsilateral und kontralateral, aus allen NF berechnet und durch den NF-Wert des einzelnen Tieres dividiert (Gleichung 6).

#### **Gleichung 6: Berechnung des Normalisierungsfaktors bezogen auf alle Tiere**

$$NF = \frac{NF_{\text{Tier } x}}{\sqrt[n]{NF_{\text{Tier } 1} \times NF_{\text{Tier } 2} \times \dots \times NF_{\text{Tier } n}}} = \frac{NF_{\text{ipsilateral Tier } x}}{\text{Geometrisches Mittel } NF_{\text{ipsilateral Tier } 1 \text{ bis } n}} \quad \text{oder} \quad \frac{NF_{\text{kontralateral Tier } x}}{\text{Geometrisches Mittel } NF_{\text{kontralateral Tier } 1 \text{ bis } n}}$$

NF = Normalisierungsfaktor

Der berechnete ipsi- bzw. kontralaterale NF-Wert des jeweiligen Tieres wurde für die Normalisierung der relativen Expressionsänderung der Zielgene verwendet, siehe Gleichung 3.

## **2.4. Verhaltensexperimente**

Als Maß für den Krankheitsverlauf wurde das schmerzassoziierte Verhalten der Versuchstiere, deren Spinalganglien für die mRNA-Expressionsanalysen im Verlauf der AIA verwendet wurden, untersucht. Unmittelbar vor dem Töten der Tiere wurden verschiedene Verhaltensversuche durchgeführt. Um die Ratten an die Versuchsbedingungen zu gewöhnen und die Ergebnisse nicht durch ängstliches Verhalten der Tiere zu verfälschen, wurden sie an je zwei weiteren Tagen vor dem eigentlichen Test an die Bedingungen gewöhnt.

### **2.4.1. Fortbewegungsverhalten der Versuchstiere**

Das Fortbewegungsverhalten der Tiere, d.h. das Einnehmen von Schonhaltungen während einer schmerzhaften Entzündung, hier der AIA, wurde durch einen so genannten *Score* des Laufverhaltens definiert. Dazu wurden die Tiere veranlasst, durch einen Tunnel zu laufen. Der *Score* wurde wie folgt festgelegt: 0 = normales Laufverhalten; 1 = Schonverhalten der Hinterpfote nach einer noxischen Kompression des entzündeten Knies; 2 = deutliches Hinken der Ratte während des Laufens; 3 = kein Gebrauch der Hinterpfote mit entzündeten Knie; 4 = keine Fortbewegung

### **2.4.2. Bestimmung der Gewichtsverteilung zwischen den Hinterbeinen**

Mit der Entwicklung der AIA und der Entzündung im Knie entwickeln die Tiere Schonhaltungsmechanismen, unter anderem verlagern sie ihr Gewicht im Stehen auf das gesunde Bein. Mit dem Incapacitance-Tester (Lincoln Instrumentation, Norfolk, UK) wurde diese Lastverlagerung durch zwei separat angeordnete Druckmessfühler gemessen. Die Ratten wurden in einen Plexiglaskäfig gesetzt. Die Hinterpfoten wurden auf die separaten Druckmessfühler am Boden des Käfigs platziert. Die Durchschnittskörpergewichtsverteilung in Gramm wurde in einem Intervall von drei Sekunden gemessen. Die relative Verteilung wurde nach folgender Gleichung 7 von McDougall et al. (2006) berechnet:

#### **Gleichung 7: Berechnung der relativen Gewichtsverteilung**

$$\text{Relative Verteilung (\%)} = \frac{\text{mittleres Gewicht linke Pfote}}{\text{mittleres Gewicht linke Pfote} + \text{mittleres Gewicht rechte Pfote}} \times 100\%$$

Ein Ergebnis von 50% bedeutet, dass das Gewicht auf beide Pfoten gleich verteilt wurde, was die normale bzw. gesunde Situation widerspiegelt.

### **2.4.3. Kniegelenkschwellung**

Nach der Auslösung der AIA im linken Knie der Ratte kam es besonders im akut entzündeten Stadium zu Gelenkschwellungen. Der mediolaterale Durchmesser wurde bei jedem Tier vor der Auslösung der AIA gemessen sowie unmittelbar vor dem Töten der Tiere, an Tag 0, nach 6-8 h, an Tag 1, Tag 3 und Tag 21. Dazu wurde mit dem Oditest-Schnelltaster der Durchmesser beider Knie bestimmt und die Zunahme in mm vor und nach Auslösung der Arthritis zu jedem Zeitpunkt berechnet. Vom Kniedurchmessermittelwert am Tag 0 wurden die Kniedurchmesser der Versuchsratten subtrahiert. So konnten diese Werte als Gelenkschwellung für eine statistische Auswertung mit verwendet werden.

### **2.4.4. Testung der Entwicklung einer sekundären Hyperalgesie**

Die Entwicklung einer sekundären Hyperalgesie auf der Seite des arthritischen Knies (entzündete ipsilaterale Seite) wurde an den Fußsohlen der Hinterpfoten getestet, einer Region, die außerhalb des entzündeten Areals liegt, jedoch neuronale Projektionen zu denselben Rückenmarksegmenten besitzt. Zum Vergleich wurde auch jeweils die nicht entzündete kontralaterale Seite getestet.

#### **1. Sekundäre mechanische Hyperalgesie**

Die Entwicklung einer sekundär mechanischen Hyperalgesie wurde durch die Veränderung der taktilen Empfindlichkeit an der Fußsohle der Ratte getestet. Dazu wurde ein dynamisches planares Ästhesiometer verwendet, eine automatisierte „von Frey Haar-Untersuchung“. Dazu wurde ein Versuchstier in einen Käfig mit Maschendraht am Boden gesetzt. Das Tier durfte sich zunächst an die Umgebung gewöhnen. Unter die Fußsohle der Ratte wurde dann ein stumpfes 0,5 mm dickes Filament platziert und mit steigender Kraft von 0-50 g innerhalb von 20 s gegen die Fußsohle gedrückt. Der Vorgang wurde unterbrochen, wenn das Tier seinen Fuß wegzog. Bei Unterbrechung maß das Gerät automatisch Zeitpunkt und die Gewichtskraft des von Frey Haares. Um Verletzungen zu vermeiden, wurde die Messung spätestens nach 20 s bei Erreichen einer Gewichtskraft von 50 g beendet. Die Messungen erfolgten abermals dreimal, wobei zwischen den Hinterpfoten gewechselt wurde und die Stimuli am gleichen Fuß

höchstens alle 2 Minuten wiederholt wurden. Die Wegziehschwelle und das Wegziehgewicht der Messungen wurden jeweils gemittelt.

## 2. Sekundäre thermischen Hyperalgesie

Für die Testung der thermischen sekundären Hyperalgesie wurde der sog. Hargreaves-Test mit einem *Algesimeter* durchgeführt. Das jeweilige Versuchstier wurde in einen Plexiglaskäfig gesetzt und zunächst an die Umgebung gewöhnt. Danach wurde ein Hitzestimulus von 52 °C durch einen Laserstrahl abwechselnd auf beide Fußsohlen der Hinterpfoten appliziert. Durch eine Lichtschranke wurde die Hitzezufuhr automatisch unterbrochen, wenn das Tier die Pfote wegzog. Diese Zeit vom Reizbeginn bis zum Wegziehen der Pfote – Wegziehschwelle - wurde gemessen. Um eine Verletzung des Tieres zu vermeiden, wurde die Messung spätestens nach 20 s abgebrochen. Die Messung wurde für jede Seite dreimal wiederholt, wobei zwischen den Hinterpfoten gewechselt wurde und die Stimuli am gleichen Fuß höchstens alle zwei Minuten wiederholt wurden. Die Wegziehschwellen dreier Messungen nach Hitzereiz wurden gemittelt.

## 2.5. Statistische Auswertungen

Die erhobenen Daten wurden statistisch ausgewertet und Unterschiede auf ihre Signifikanz mit dem Programm SPSS 14.0 für Windows getestet. Zunächst wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest die Daten auf Normalverteilung hin überprüft. Lag eine solche vor, wurde bei unabhängigen Stichproben eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, um die Daten auf signifikante Varianzunterschiede hin zu überprüfen. Lagen Unterschiede vor, wurde im post-hoc Bonferroni-Test auf der 0,05 Signifikanzebene berechnet, zwischen welchen Gruppen bzw. Stichproben Unterschiede vorliegen und welcher p-Wert sich dabei ergab.

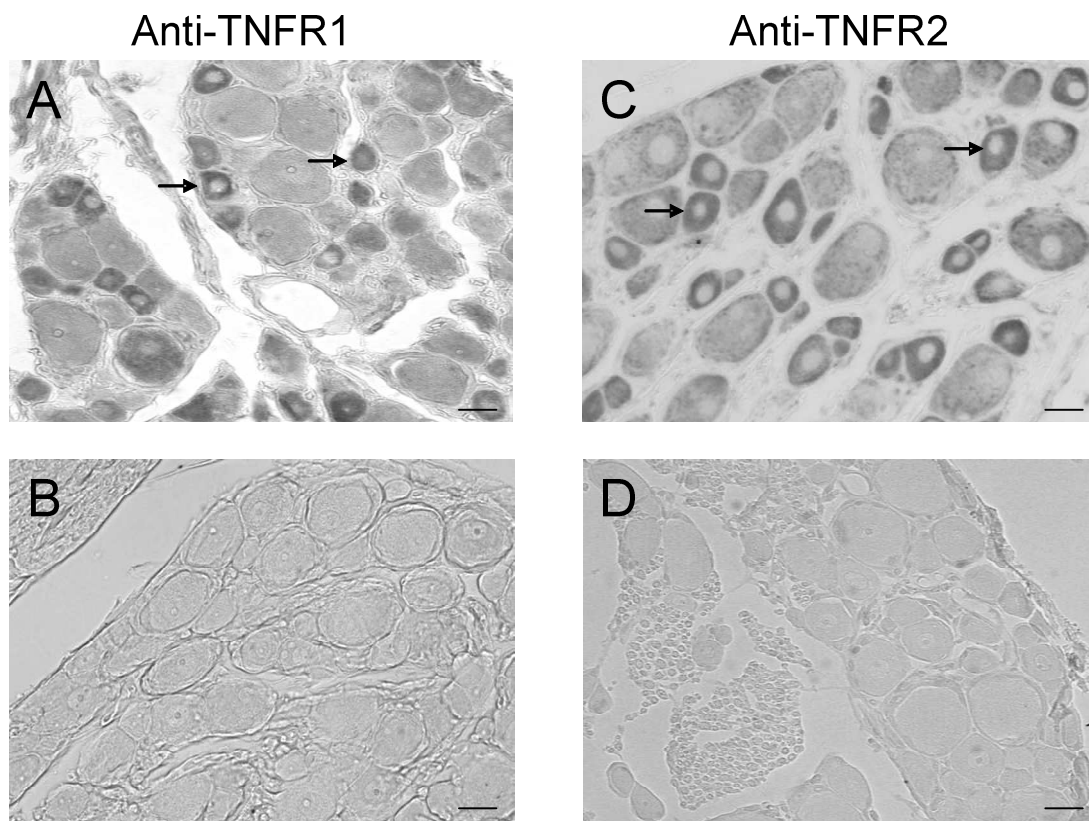
Die Ergebnisse der sekundären Hyperalgesie (siehe Abschnitt 3.3.) wurden auf Normalverteilung mit Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest getestet. Mit dem t-Test wurden die unabhängigen Stichproben paarweise auf ihre Signifikanz getestet und die p-Werte mit der Bonferroni-Holm-Prozedur auf dem 5%  $\alpha$ -Niveau ( $\alpha = 0,05$ ) korrigiert. Dafür wurden die p-Werte in aufsteigender Reihenfolge sortiert und in absteigender Reihenfolge der Testanzahl geteilt. Ist der p-Wert größer oder gleich 0,05 liegt keine Signifikanz mehr vor.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Immunhistochemische Markierungen an Spinalganglien der Ratte**

##### **3.1.1. Darstellung von TNF-Rezeptoren in Spinalganglienschnitten der Ratte**

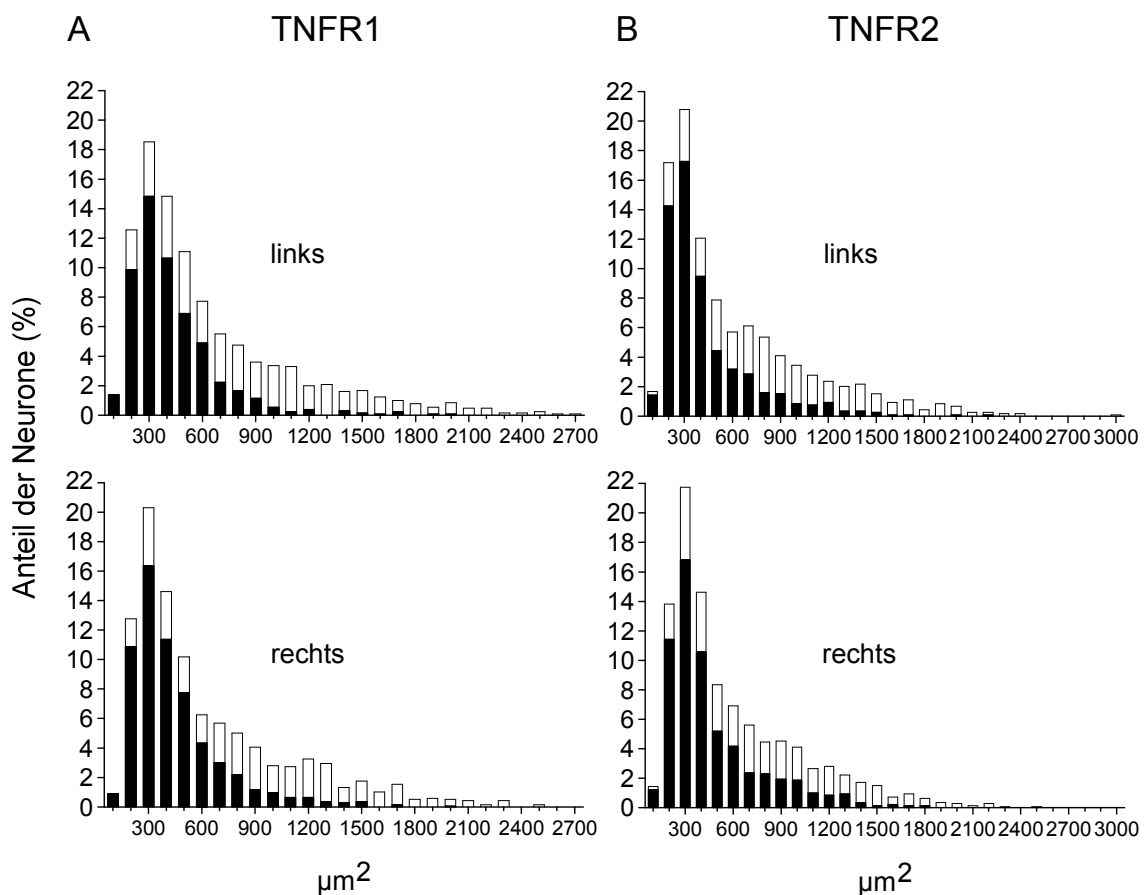
Zunächst sollte die Expression von TNF-Rezeptorproteinen in Spinalganglienneuronen nachgewiesen werden. Dazu wurden, wie unter Abschnitt 2.2.4. beschrieben, histologische Schnitte der Spinalganglien gesunder erwachsener Lewisratten verwendet. TNFR1- und TNFR2-Markierungen an lumbalen Spinalganglienschnitten von Lewisratten sind in Abbildung 3.1 dargestellt (siehe Methode 2.2.9.). (A) zeigt eine Markierung mit dem TNFR1-Antikörper, (C) mit dem TNFR2-Antikörper. (B) und (D) zeigen Kontrollmarkierungen ohne 1. Antikörper.



**Abb. 3.1: Anti-TNF-Rezeptor-markierte lumbale Spinalganglienschnitte.** Die Pfeile in (A) und (C) zeigen Beispiele TNFR1- bzw. TNFR2-positiver Neurone eines zufällig ausgewählten lumbalen Schnittes. (B) und (D) zeigen entsprechende Kontrollmarkierungen ohne Verwendung des 1. Antikörpers. Der Maßstab entspricht 20 µm.

TNF-Rezeptor-markierte Schnitte wurden bezüglich des prozentualen Anteils positiver Neurone sowie der Größenverteilung dieser Neurone ausgewertet, um sie Neuronentypen zuzuordnen zu können (siehe 2.2.10.). Dazu wurden von jeweils 5 Kontrolltieren lumbaler Spinal-

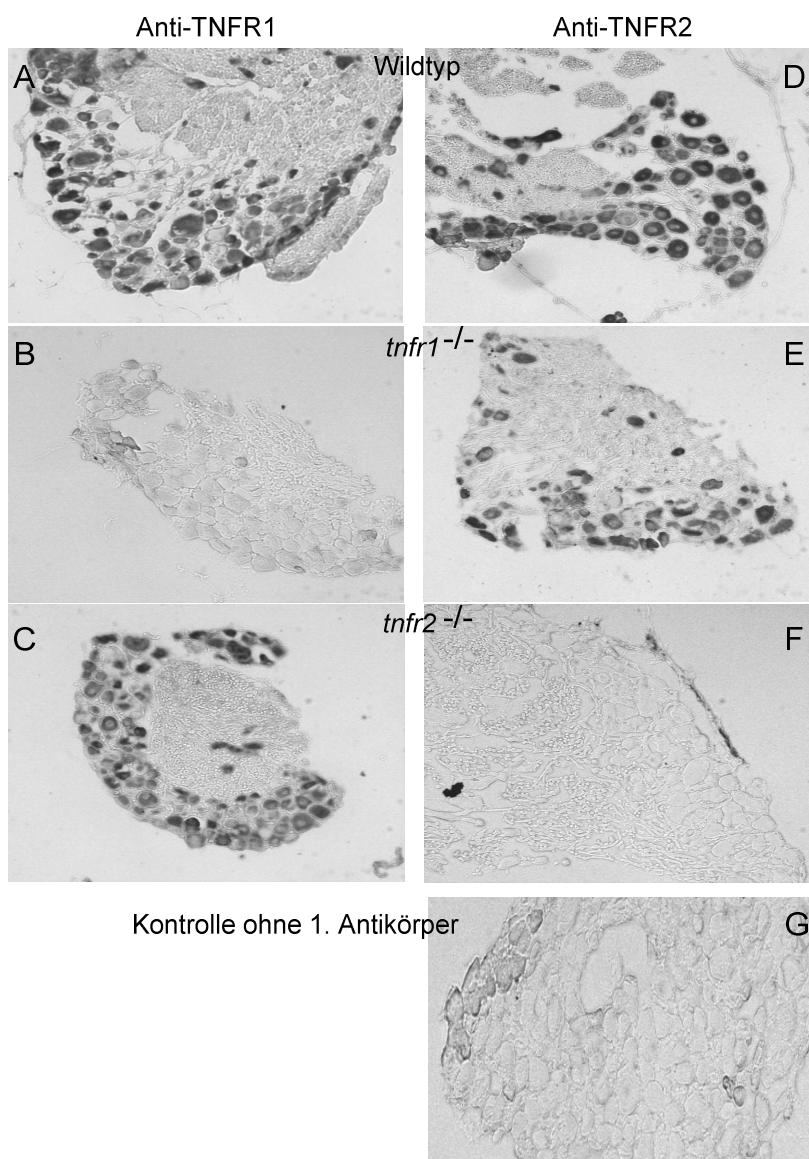
ganglienschnitte, getrennt nach rechter und linker Seite, ausgewertet, und als Mittelwert der Neurone  $\pm$  Standardfehler angegeben.  $55,7\% \pm 1,9\%$  der Neurone links und  $61,6\% \pm 1,4\%$  rechts waren TNFR1-positiv (siehe Kontrolle Abb.3.6 A). Außerdem waren  $60,1\% \pm 1,9\%$  links und  $61,2\% \pm 2,2\%$  rechts der Neurone TNFR2-positiv (siehe Kontrolle Abb. 3.6 (B)). In Abbildung 3.2 (A) und (B) ist die Größenverteilung der Neurone in  $\mu\text{m}^2$  dargestellt. Die schwarzen Einlagen in (A) zeigen den Anteil TNFR1-positiver Neurone. 58% der kleinen bis mittelgroßen Neurone (bis  $1000 \mu\text{m}^2$ ) links und 65% der Neurone rechts waren TNFR1-positive Neurone, wohingegen lediglich 6,4% der großen Neurone (ab  $1000 \mu\text{m}^2$ ) links und 8,8% rechts zu TNFR1-positiv waren.



**Abb. 3.2: Größenverteilung der Spinalganglienneurone und der Anteil TNF-Rezeptor-positiver Neurone in Prozent.** (A) und (B) zeigen die Größenverteilung der Neurone in gesunden nicht behandelten Kontrollratten ( $n = 5$ , mindestens 500 Neurone), an lumbalen Spinalganglienschnitten getrennt nach links und rechts. Die schwarzen Einlagen in (A) zeigen den entsprechenden Anteil TNFR1-positiv markierter Neurone, in (B) den Anteil TNFR2-positiv markierter Neurone.

Die Größenverteilung TNFR2-positiver Neurone in (B) (schwarze Einlagen) war ähnlich der TNFR1-positiven Neurone. Hier waren 57,8% der kleinen bis mittelgroßen Neurone (bis  $1000 \mu\text{m}^2$ )

$\mu\text{m}^2$ ) links und 62,2% der Neurone rechts TNFR2-positive Neurone, wohingegen lediglich 11,7% der großen Neurone (ab  $1000\mu\text{m}^2$ ) links und 14,9% rechts zu TNFR2-positiv waren. Aus der Größenverteilung der Neurone konnte geschlussfolgert werden, dass die Rezeptorproteine TNFR1 und -R2 vorwiegend in C- und  $\text{A}\delta$ -Neuronen exprimiert wurden (Lawson und Waddell 1991). Um die Spezifität der verwendeten TNFR1- und TNFR2-Antikörper zu überprüfen, wurden Experimente an Schnitten von Spinalganglien aus *TNFR1-knockout*- und *TNFR2-knockout*- Mäusen (*tnfr1*<sup>-/-</sup>, *tnfr2*<sup>-/-</sup>) durchgeführt (siehe Methode 2.2.9.). In Abbildung 3.3 sind Markierungen an Mausganglien dargestellt. Beide Rezeptoren konnten in der Wildtypmaus ((A) und (D)) mit den verwendeten Antikörpern nachgewiesen werden.



**Abb. 3.3: TNF-Rezeptor-Markierungen an Mausganglien.** Die Spinalganglienneurone in Schnitten von Wildtypmäusen sowie an *tnfr1*<sup>-/-</sup>- und *tnfr2*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden mit spezifischen TNF-Rezeptor-Antikörpern markiert. Beide TNF-Rezeptoren konnten an Wildtypmäusen nachgewiesen werden ((A) und (D)). TNFR1 konnte nicht an der *tnfr1*<sup>-/-</sup>-Maus (B) jedoch an der *tnfr2*<sup>-/-</sup>-Maus (C) nachgewiesen werden. Das gleiche gilt umgekehrt für TNFR2 (E) und (F). Die Kontrolle (G) ohne ersten Antikörper an der Wildtypmaus zeigt keine Markierung.

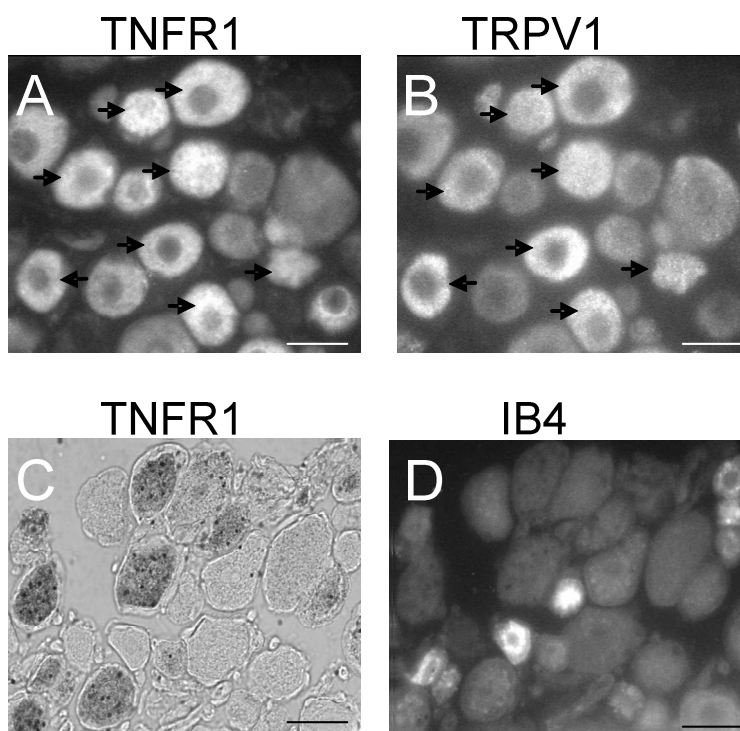
Die *tnfr1*<sup>-/-</sup>-Maus zeigte keine Immunoreaktivität bei der Anti-TNFR1-Markierung (B), jedoch an der Anti-TNFR2-Markierung (E). Umgekehrt zeigte die Anti-TNFR2-Markierung

keine Immunoreaktivität in der *tnfr2*<sup>-/-</sup>-Maus (F), jedoch wurden Neurone bei der Anti-TNFR1-Markierung (C) markiert. Eine Kontrollmarkierung (G) ohne ersten Antikörper in der Wildtypmaus zeigte keine Markierungen, so dass unspezifische Reaktionen des 2. Antikörpers ausgeschlossen wurden.

Es konnte somit nachgewiesen werden, dass beide Antikörper sehr spezifisch nur den TNFR1 oder den TNFR2 markierten und keine Kreuzreaktivität zwischen den Antikörpern und den Rezeptorproteinen auftrat.

### **3.1.2. Charakterisierung von TNFR1-positiven Spinalganglienneuronen**

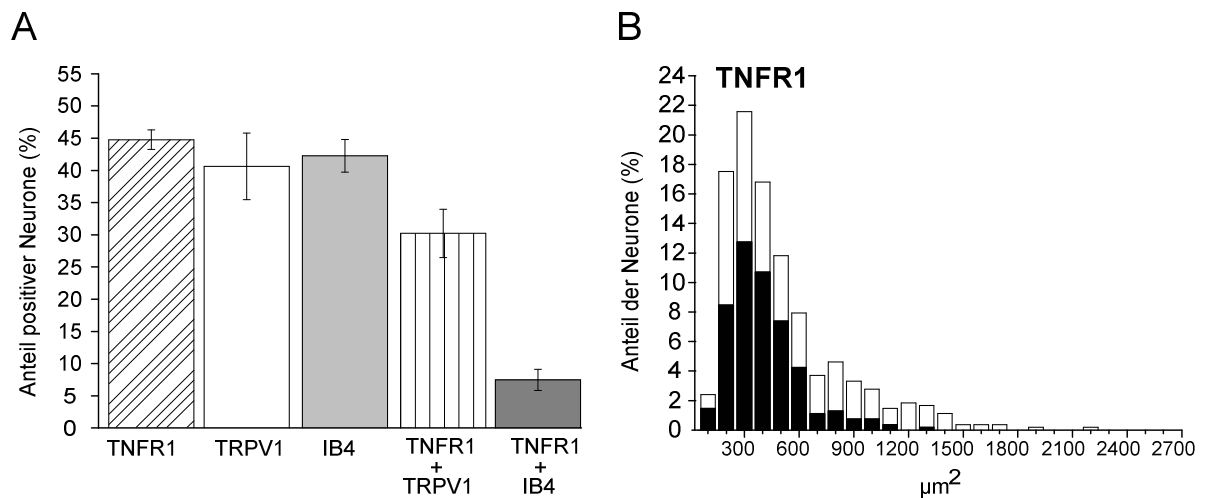
Durch Doppelmarkierungen sollten TNFR1-positive Neurone genauer charakterisiert werden. Die Charakterisierung der TNFR2-positiven Neurone war zu diesem Zeitpunkt aus Mangel an geeigneten 2. Antikörpern leider nicht möglich. Dazu wurde eine Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen TNFR1 und TRPV1 an Spinalganglienschnitten von Wistarratten (n = 5) durchgeführt (siehe Methode 2.2.7.). (A) und (B) in Abbildung 3.4 zeigen den gleichen Ausschnitt eines repräsentativen Schnittes dieser Doppelmarkierung. Die mit Pfeilen versehenen Zellen weisen auf doppelt-markierte Zellen hin.



**Abb. 3.4: Neuronendoppelmarkierung in Spinalganglienschnitten.** (A), (B), (C) und (D) zeigen Photos von markierten Spinalganglienschnitten mit verschiedenen Antikörpern. Der Maßstab entspricht 25 µm. In (A) wurden TNFR1-positive Neurone markiert, (B) zeigt am gleichen Ausschnitt des Spinalganglienschnittes TRPV1-positive Neurone. Die Pfeile weisen auf doppelt markierte Neurone hin. Bild (C) zeigt TNFR1-positive Neurone. Bild (D) zeigt im gleichen Ausschnitt eine Isolectin IB4-Markierung (IB4).



Des Weiteren wurde eine Doppelmarkierung gegen TNFR1 und Isolectin B4 (IB4) durchgeführt ( $n = 7$ ) (siehe Methode 2.2.5.). IB4 markierte spezifisch, kleine bis mittelgroßen Neurone, die zur Gruppe der nicht-peptidergen, unmyelinisierten Neuronen gehörten. In (C) und (D) der Abbildung 3.4 wurde an einem typischen Schnitt diese Doppelmarkierung dargestellt. Die Mittelwerte der markierten Neurone mit den entsprechenden Standardfehlern in Prozent wurden in Abbildung 3.5 (A) graphisch dargestellt.  $44,7\% \pm 1,5\%$  der Neurone waren TNFR1 und  $40,6\% \pm 5,2\%$  der Neurone TRPV1-positiv (siehe Methode 2.2.8.). Ca. 70% der TNFR1-positive Zellen waren auch positiv für eine TRPV1-Markierung.  $42,3\% \pm 2,6\%$  der Neurone waren IB4-positiv (siehe Methode 2.2.6.). Jedoch nur ca. 17% der TNFR1-positiven Zellen waren auch von IB4 markiert. In (B) wurden die Neurone hinsichtlich ihrer prozentualen Größenverteilung in  $\mu\text{m}^2$  dargestellt (siehe Methode 2.2.8.). Die schwarzen Einlagen zeigten den Anteil TNFR1-positiver Neurone.  $45,6\%$  der kleinen bis mittelgroßen Neurone (bis  $1000 \mu\text{m}^2$ ) waren TNFR1-positive Neurone, wohingegen lediglich 4% der großen Neurone (ab  $1000 \mu\text{m}^2$ ) TNFR1-positiv waren.



**Abb. 3.5: Charakterisierung TNFR1-positiver Neurone in Spinalganglienschnitten der gesunden Wistar-ratte.** In (A) wurden die Anteile einfach und doppelt markierter Neurone in Prozent grafisch dargestellt; Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM); (B) zeigt die Größenverteilung der Neurone an Spinalganglienschnitten der Wistar-ratte, die schwarzen Einlagen zeigen den jeweiligen Anteil TNFR1-positiver Neurone. TNFR1/TRPV1-Markierung  $n = 5$ , TNFR1/IB4-Markierung  $n = 7$ .

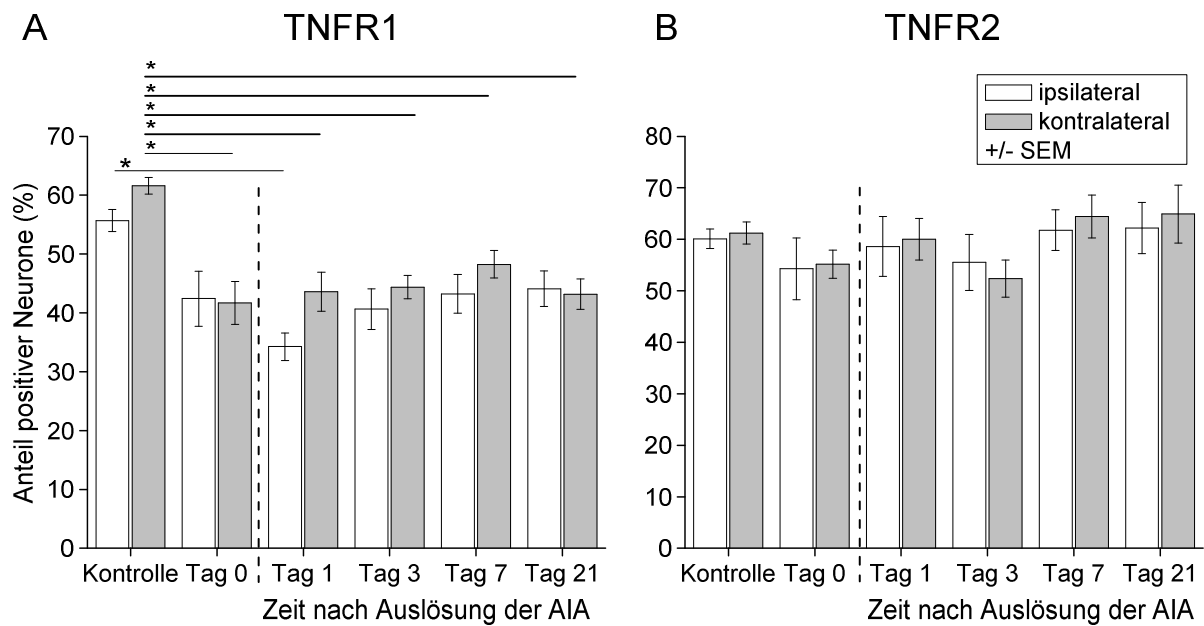
Die Größenverteilung der Neurone in Spinalganglienschnitten aller Spinalganglien der Wistar-ratten war äquivalent der Verteilung in den lumbalen Spinalganglien der Lewis-ratte (siehe Abbildung 3.2). Auch war die Verteilung positiver TNFR1-Neurone vergleichbar. Der überwiegende Anteil der Neurone war klein bis mittelgroß, wobei die absoluten Werte etwas differierten.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass ca. 2/3 der TNFR1-positiven Spinalganglienneurone auch TRPV1-positiv waren, nicht jedoch positiv für IB4. Das spricht dafür, dass TNFR1 überwiegend an peptidergen nozizeptiven Neuronen gebildet wurde.

### **3.1.3. TNF-Rezeptorproteinexpression im Verlauf einer Antigen-induzierten Arthritis**

Im folgendem wurde die TNFR1- und TNFR2-Rezeptorproteinexpression im Verlauf einer Antigen-induzierte Arthritis (AIA) verfolgt. Dazu wurden, wie in Abschnitt 2.2.2. und 2.2.4. beschrieben, die lumbalen Ganglien L1-L5 getrennt für die Körperseiten präpariert, eingebettet und Paraffinschnitte hergestellt. Die Entnahme erfolgte an Tag 1, 3, 7 und 21 nach Induktion der AIA. Als Kontrollen dienten einerseits immunisierte Tiere, bei denen keine Arthritis ausgelöst wurde (Tag 0) sowie andererseits alters- und geschlechtsgleiche gesunde Ratten (Kontrolle). Pro Tier und Seite wurden mindestens 100 Neurone ausgewertet (siehe Methode 2.2.10.). Der Anteil positiv markierter Neurone im Verlauf der AIA sowie der Kontrolltiere und der Tag 0-Tiere sind für beide TNF-Rezeptoren in Abbildung 3.6 dargestellt.

In (A) wurde der Anteil positiver Neurone mit TNFR1-Markierung ipsilateral (entzündete Seite) und kontralateral (nicht entzündete Seite), in der Kontrolle, an Tag 0 sowie im Verlauf der AIA gezeigt. Die Daten zeigen, dass der Anteil der TNFR1-positiven Neurone im Verlauf der AIA (Tag1-Tag 21) ipsilateral und kontralateral durchschnittlich bei 40-45% lag und sich nicht änderte. Der Anteil positiv markierter Zellen nahm um ca. 15% ab, wenn man Kontrolltiere (links) mit Tieren von Tag 0 und AIA-Tieren verglich. Es gab ipsilateral einen signifikanten Rückgang an markierten Zellen zwischen den Kontrolltieren und Tag 1 ( $p = 0,023$ ). Kontralateral gab es jeweils einen signifikanten Rückgang (15-20%) zwischen den Kontrolltieren und allen anderen Zeitpunkten (Tag 0  $p < 0,0001$ , Tag 1  $p = 0,003$ , Tag 3  $p = 0,002$ , Tag 7  $p = 0,025$  und Tag 21  $p = 0,001$ ). Die normal verteilten Daten wurden post-hoc im Bonferroni-Test (\*) auf dem 0,05 Signifikanzniveau getestet (siehe Methode 2.5). Abbildung 3.6 (B) zeigt den Anteil der Neurone mit positiver TNFR2-Markierung ipsilateral und kontralateral in der Kontrolle, an Tag 0 sowie im Verlauf der AIA. Die Anzahl der TNFR2-positiv markierten Zellen (ca. 60 %) änderte sich zu keinem Zeitpunkt, weder durch Immunisierung der Tiere noch durch die Induktion der Arthritis.



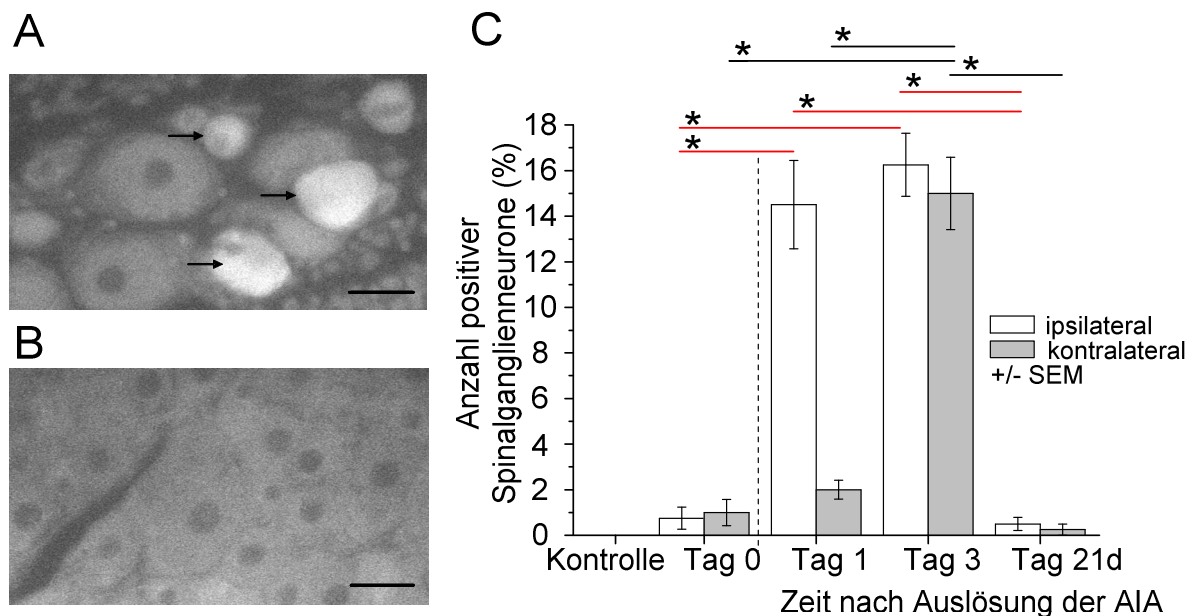
**Abb. 3.6: TNFR1- und TNFR2-Proteinexpression in lumbalen Spinalganglienschnitten an Kontrolltieren, immunisierten Ratten und nach Auslösung einer AIA am Tag 1, 3, 7 und 21.** In (A) und (B) wurde der Anteil der Neurone mit positiver TNFR1- bzw. TNFR2-Markierung an unbehandelten Kontrollratten, an immunisierten Ratten (Tag 0) sowie im Verlauf der AIA am Tag 1, 3, 7 und 21 Tag dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  im Mittelwertvergleich des Bonferroni-Test; Die Anzahl der Ratten für die TNFR1-Markierung betrug  $n = 5$  in den Kontrolltieren,  $n = 3$  am Tag 1 und  $n = 4$  an allen anderen Versuchstagen. Für die TNFR2-Markierung wurden jeweils  $n = 5$  Versuchstiere in den Kontrollen sowie an Tag 0, 1, 3 und 21 und  $n = 6$  Versuchstiere am Tag 7 verwendet.

Im Verlauf der AIA änderte sich der Anteil TNFR1- und TNFR2-positiver Neurone weder ipsilateral noch kontralateral, obschon die Immunisierung an sich einen Rückgang TNFR1-positiver Zellen ipsi- als auch kontralateral von Kontrolltieren zu immunisierten Tieren an Tag 0 und AIA-Tieren von ca. 15-20% bewirkte. Der Rückgang war z.T. signifikant. Dagegen lag der Anteil TNFR2-positiver Neurone unabhängig von der Immunisierung oder der Auslösung einer AIA bei ca. 60%.

### 3.1.4. Darstellung von TNF- $\alpha$ in Spinalganglienschnitten

Zusätzlich zur TNF-Rezeptormarkierung wurde eine immunhistochemische Markierung des Zytokins TNF- $\alpha$  in Spinalganglien-neuronen immunisierter Ratten (Tag 0), an Tieren der AIA an Tag 1, 3 und 21 sowie an alters- und geschlechtsgleichen gesunden Ratten (Kontrolle) durchgeführt (siehe 2.2.12.). Pro Tier und Seite wurden 100 Neurone ausgewertet (siehe Methode 2.2.12.) Abbildung 3.7 (A) zeigt einen repräsentativen ipsilateralen Schnitt, die mit Pfeilen markierten Zellen wurden als positiv gezählt. Eine Kontrollmarkierung (B) ohne ers-

ten Antikörper zeigte keine Markierungen. Der Anteil positiver Neurone in Prozent in den Kontrolltieren und im Verlauf der AIA wurde in (C) dargestellt (siehe Methode 2.2.13.). In den Kontrolltieren konnten keine positiv markierten Neurone gefunden werden. Nach der Immunisierung wurden an Tag 0 vereinzelt positive Neurone beobachtet. Ipsilateral konnte bereits an Tag 1 sowie an Tag 3 nach Auslösung der AIA eine signifikante Steigerung positiver Zellen festgestellt werden, mit  $p < 0,0001$ . Der erhöhte Anteil blieb bis Tag 3 erhalten um dann an Tag 21 auf Immunisierungsniveau abzufallen. Der Rückgang von Tag 1 und Tag 3 zu Tag 21 ist mit  $p < 0,0001$  signifikant. Auf der kontralateralen Seite wurde ein leichter Anstieg der Neurone mit positiver TNF- $\alpha$ -Markierung schon an Tag 1 verzeichnet. Eine signifikante Erhöhung, wie auf der ipsilateralen Seite, fand Zeit verzögert erst an Tag 3 statt, mit  $p < 0,0001$  von Tag 0 und Tag 1 zu Tag 3. An Tag 21 fiel der Anteil positiver Neurone ebenfalls auf das Immunisierungsniveau ab, mit  $p < 0,0001$  von Tag 3 zu Tag 21. In Abbildung 3.7 (C) sind die signifikanten Änderungen mit (\*) markiert. Die normalverteilten Daten wurden post-hoc im Bonferroni-Test (\*) auf dem 0,05 Signifikanzniveau getestet.



**Abb. 3.7: TNF- $\alpha$  Proteinexpression in lumbalen Spinalganglienschnitten an Kontrolltieren, immunisierten Ratten und nach Auslösung einer AIA am Tag 1, 3 und 21.** Die Pfeile in (A) zeigen Beispiele TNF- $\alpha$ -positiver Neurone eines zufällig ausgewählten lumbalen ipsilateralen Schnittes nach Auslösung einer AIA. (B) zeigt eine Kontrollmarkierung ohne Verwendung des 1. Antikörpers. Der Maßstab entspricht 25  $\mu$ m. In (C) wurde der Anteil positiv markierter TNF- $\alpha$ -Neurone an unbehandelten Kontrollratten, an immunisierten Ratten (Tag 0) sowie im Verlauf der AIA am Tag 1, 3 und 21 Tag dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  im Mittelwertvergleich des Bonferroni-Test, rote Linie Signifikanz ipsilateral, schwarze Linie Signifikanz kontralateral. Die Anzahl der Ratten für die TNF- $\alpha$  Markierung betrug  $n = 4$  an allen Versuchstagen.

Die TNF- $\alpha$ -positiven Spinalganglienneurone traten vereinzelt nach der Aktivierung des Immunsystems der Ratte auf. Erst nach Auslösung der AIA konnte eine deutliche Zunahme TNF- $\alpha$ -positiver Neurone auf der ipsilateralen und Zeit verzögert auf der kontralateralen Seite beobachtet werden. Am Tag 21, als bereits eine chronische Arthritis vorlag, ging die Anzahl positiver Neurone auf das Immunisierungsniveau zurück. Die Ergebnisse zeigen, dass das Zytokin in der akuten Phase der AIA beidseitig auf Proteinebene stark reguliert wurde.

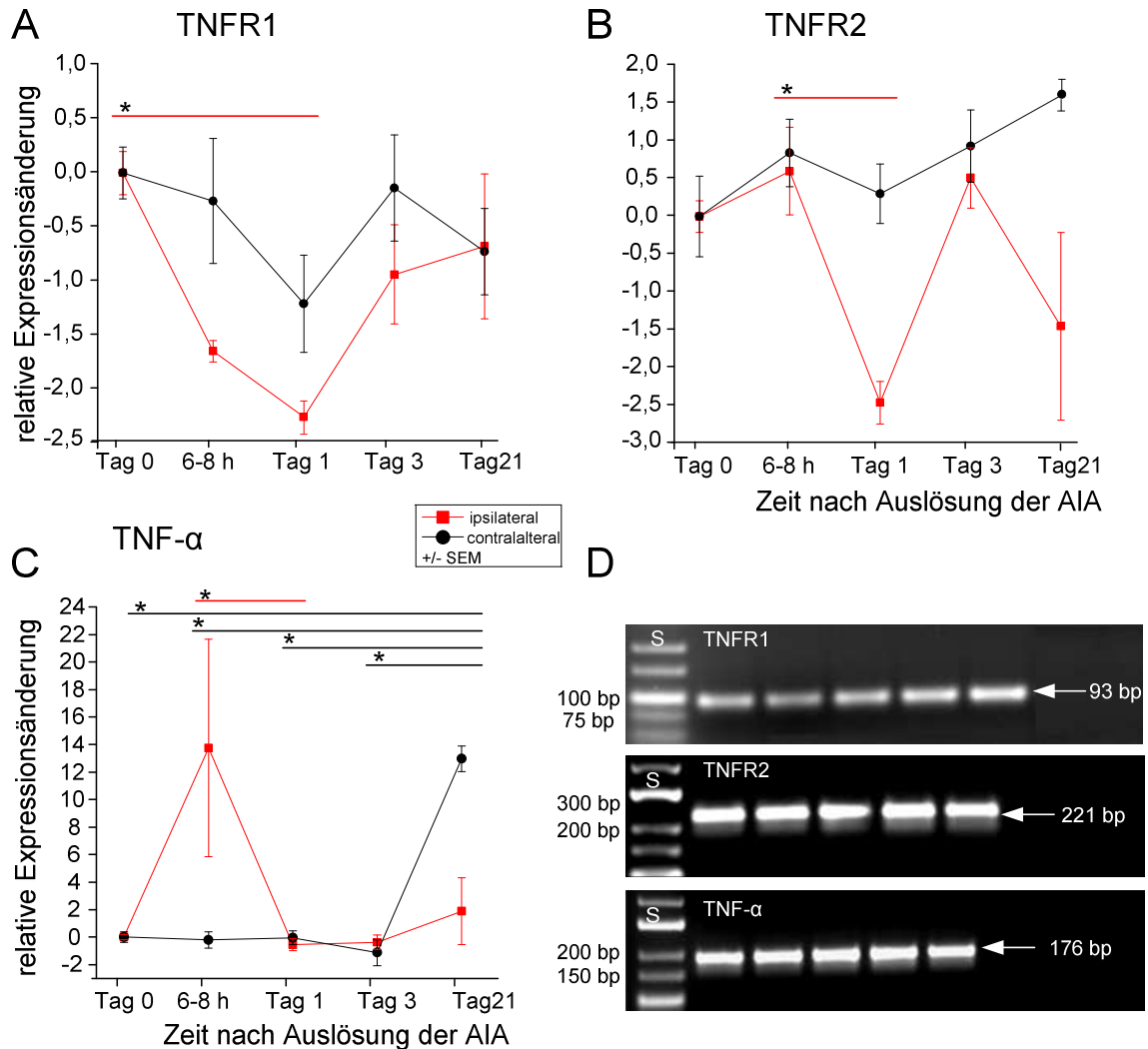
### **3.2. mRNA-Expression von Zytokinrezeptoren und Zytokinen**

Die mRNA-Expression von Zytokinrezeptoren und Zytokinen wurde im Verlauf einer AIA beobachtet. Dazu wurde bei immunisierten Lewisratten an Tag 0 eine AIA ausgelöst und die Tiere nach 6-8 h, Tag 1, Tag 3 und Tag 21 getötet (siehe Methode 2.2.1.), die lumbalen Spinalganglien präpariert (siehe Methode 2.2.2.) und die RNA extrahiert (siehe Methode 2.3.1.2.). Die Änderung der mRNA-Expression der entsprechenden Gene wurde auf die Expressionsrate zum Zeitpunkt der Immunisierung (Tag 0) bezogen, stellt somit eine sog. relative Expressionsänderung dar (siehe Methode 2.3.5.). Dabei wurden die lumbalen Spinalganglien getrennt nach entzündeter (ipsilateral) und nicht entzündeter (kontralateral) Seite ausgewertet.

#### **3.2.1. mRNA-Expression von TNF-Rezeptoren und TNF- $\alpha$**

Die mRNA-Expression von TNFR1, TNFR2 und TNF- $\alpha$  ist in Abbildung 3.8 als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Die mRNA-Expression von TNFR1 in (A) zeigt einen Rückgang der Expression ipsi- und kontralateral nach 6-8 h und Tag 1, der sich jedoch zum Tag 21 hin wieder normalisierte. Der Rückgang der Expression auf  $-2,3 \pm 0,2$  ipsilateral vom Tag 0 zu Tag 1 ist im (\*) post-hoc Bonferroni-Test ( $p < 0,05$ ) signifikant mit  $p = 0,015$ . Ein leichter, aber nicht signifikanter Rückgang konnte bei der Anzahl positiver TNFR1-Neurone, siehe Abbildung 3.6 (A), beobachtet werden. Die Expression des TNFR2 in (B) änderte sich im Verlauf der AIA kaum. Jedoch gab es ipsilateral einen signifikanten Rückgang der Expression auf  $-2,5 \pm 0,3$  von 6-8 h auf Tag 1 ((\*) post-hoc Bonferroni-Test,  $p = 0,035$ ). Die TNF- $\alpha$  mRNA-Expression (C) stieg auf der ipsilateralen Seite auf  $13,8 \pm 7,9$  bereits nach 6-8 h stark an. Am Tag 1 wurde die Basisexpression wieder erreicht. Dabei war der Rückgang von 6-8 h zu Tag 1 mit  $p = 0,028$  signifikant, die Expressionssteigerung von Tag 0 zu 6-8 h mit  $p = 0,072$  gerade nicht mehr signifikant ((\*) post-hoc Bonferroni-Test,  $p < 0,05$ ). Eine starke sig-

nifikante Steigerung der mRNA-Expression konnte auf der kontralateralen Seite am Tag 21 auf  $12,97 \pm 0,93$  beobachtet werden. Die in (C) eingezeichneten Signifikanzen im (\*) post-hoc Bonferroni-Test ( $p < 0,05$ ) betrugen zu allen Zeitpunkten  $p < 0,0001$ . (D) zeigt repräsentative 3%ige Agarosegele von elektrophoretisch aufgetrennten *real-time* PCR-Produkte von TNFR1, TNFR2 und TNF- $\alpha$  (2.3.3.1.). Die durch die Primersequenzen (2.1.4.) vorausgesagten Fragmentlängen stimmen mit den Bandengrößen im Gel überein.

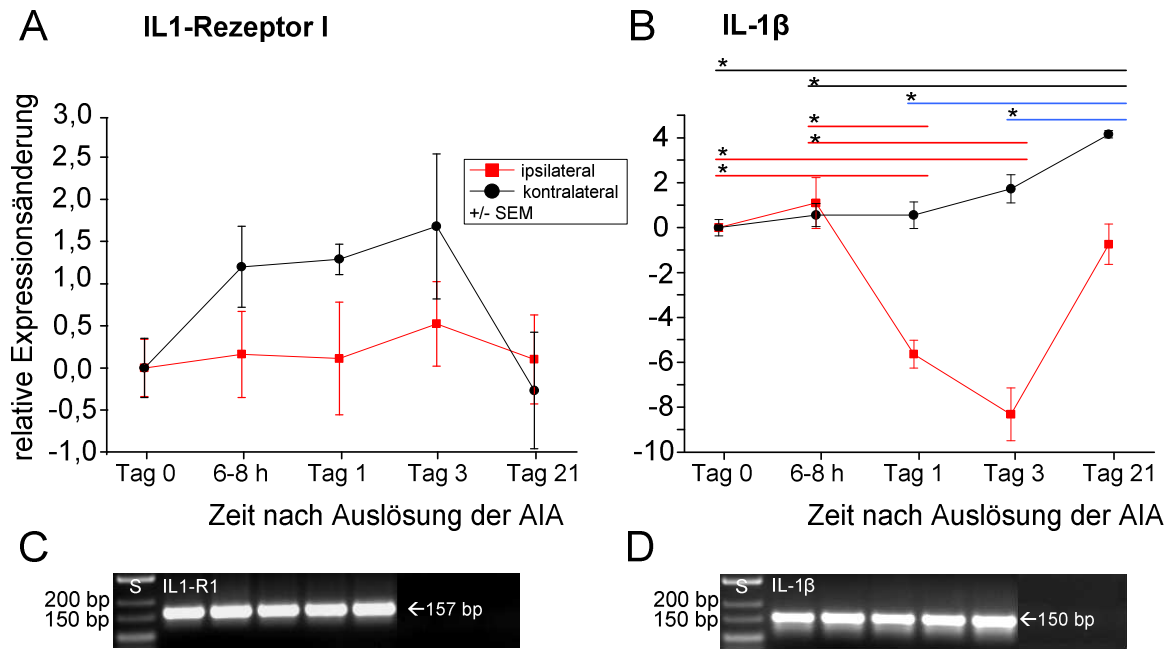


**Abb. 3.8: mRNA-Expression der TNF-Rezeptoren und TNF- $\alpha$  im Verlauf der AIA im Vergleich zu immunisierten Ratten.** Es wurden die relativen mRNA-Expressionsänderungen von TNFR1 (A), TNFR2 (B) und TNF- $\alpha$  (C) nach Auslösung der AIA nach 6-8h sowie an Tag 1, 3 und 21 in Bezug zu immunisierten Ratten (Tag 0), getrennt nach ipsilateral (rot) und kontralateral (schwarz), dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  im Mittelwertvergleich des Bonferroni-Tests, rote Linie Signifikanz ipsilateral, schwarze Linie Signifikanz kontralateral. (D) zeigt repräsentative Gelelektrophoresen der *real-time* PCR-Produkte TNFR1, TNFR2 und TNF- $\alpha$ , S = DNA-Standard. Anzahl der Versuchstiere ipsilateral  $n = 8$  an Tag 0 und 1,  $n = 7$  nach 6-8h und Tag 3 sowie  $n = 5$  an Tag 21; kontralateral  $n = 8$  nach 6-8h,  $n = 7$  an Tag 0, 1 und 3 sowie  $n = 5$  an Tag 21.

Die mRNA-Expressionen von TNFR1 und TNFR2 zeigten moderate Änderungen im Verlauf der AIA und ipsilateral einen signifikanten Expressionsrückgang an Tag 1. Die TNF- $\alpha$  Expression nahm ipsilateral nach 6-8 h stark zu und fiel dann gleich wieder ab. Die Zunahme verlief Zeit versetzt zu der Abnahme der Expression der TNF-Rezeptoren. Kontralateral nahm die Expression von TNF- $\alpha$  an Tag 21 stark zu.

### **3.2.2. mRNA-Expression von IL1-Rezeptor 1 und IL-1 $\beta$**

In unserem Labor wurde kürzlich eine IL1-Rezeptor 1-Proteinstudie (IL1-R1) in lumbalen Spinalganglien gesunder Kontrollratten, immunisierter Ratten (Tag 0) und AIA-Ratten durchgeführt. Hierbei konnte infolge von Immunisierung und manifestierter AIA eine signifikant erhöhte Zahl IL1-R1-positiver Neurone beobachtet werden. Ipsilateral als auch kontralateral lag die Expression des IL1-R1 in den Kontrolltieren bei ca. 30% der Neurone. Die Proteinexpression stieg nach der Immunisierung auf ca. 40% der Neurone an um dann im weiteren Verlauf in der AIA bis zum Tag 21 ipsilateral als auch kontralateral auf ca. 60% anzusteigen. Dabei gab es beidseitig signifikante Unterschiede zwischen Tag 0 und Tag 7 und zwischen Tag 0 und Tag 21 (Segond von Banchet et al. 2008). Daher war es naheliegend in dieser Arbeit die Expressionsänderung auch des IL1-R1 auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Die mRNA-Expressionsveränderungen des IL1-R1 und von IL-1 $\beta$  sind in Abbildung 3.9 als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Die Expression von IL1-R1 in (A) zeigte keine signifikanten Änderungen. Kontralateral stieg jedoch die mRNA-Expression zu Tag 3 hin kontinuierlich auf  $1,7 \pm 0,9$  an und fiel zu Tag 21 wieder auf Niveau der Grundexpression zurück. Die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  ist in Abbildung 3.9 (B) dargestellt. Ipsilateral ging die Expression am Tag 1 auf  $-5,6 \pm 0,6$  und weiter an Tag 3 auf  $-8,3 \pm 1,2$  zurück, um am Tag 21 nahezu die Grundexpression wieder zu erreichen. Die signifikanten Änderungen sind in (B) eingezeichnet,  $p < 0,0001$  von Tag 0 zu Tag 1 und Tag 3; von 6-8 h zu Tag 1 und Tag 3;  $p = 0,01$  von Tag 3 zu Tag 21 und  $p = 0,01$  von Tag 1 zu Tag 21(\*) im post-hoc Bonferroni-Test,  $p < 0,05$ ). Kontralateral nahm die mRNA-Expression langsam aber kontinuierlich bis zum Tag 21 auf  $4,2 \pm 0,2$  zu. Die Änderungen von allen Zeitpunkten zu Tag 21 waren im post-hoc Bonferroni-Test ( $p < 0,05$ ) signifikant (\*),  $p = 0,05$  von Tag 0 zu Tag 21,  $p = 0,04$  von 6-8 h zu Tag 21,  $p = 0,015$  von Tag 1 zu Tag 21 und  $p = 0,02$  von Tag 3 zu Tag 21. Abbildung (C) und (D) zeigen repräsentative 3%ige Agarosegele von elektrophoretisch aufgetrennten *real-time* PCR-Produkten von IL1-R1 und IL-1 $\beta$ . Die durch die Primersequenzen (siehe Methode 2.1.4) vorausgesagten Fragmentlängen stimmten mit den Bandengrößen im Gel überein.



**Abb. 3.9: mRNA-Expression des IL1-Rezeptor 1 und von IL-1β im Verlauf der AIA im Vergleich zu immunisierten Ratten.** Es wurde die relative mRNA-Expressionsänderung von IL1-R1 (A) und IL-1β (B) nach Auslösung der AIA nach 6-8h sowie an Tag 1, 3 und 21 in Bezug zu immunisierten Ratten (Tag 0), getrennt nach ipsilateral (rot) und kontralateral (schwarz), dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  im Mittelwertvergleich des Bonferroni-Tests, rote Linie Signifikanz ipsilateral, schwarze Linie Signifikanz kontralateral, blaue Linie Signifikanz ipsilateral als auch kontralateral. (C) und (D) zeigt jeweils repräsentative Gelelektrophoresen der *real-time* PCR-Produkte IL1-R1 (C) und IL-1β (D), S = DNA-Standard. Anzahl der Versuchstiere ipsilateral  $n = 8$  an Tag 0 und 1,  $n = 7$  nach 6-8h und Tag 3 sowie  $n = 5$  an Tag 21; kontralateral  $n = 8$  nach 6-8h,  $n = 7$  an Tag 0, 1 und 3 sowie  $n = 5$  an Tag 21.

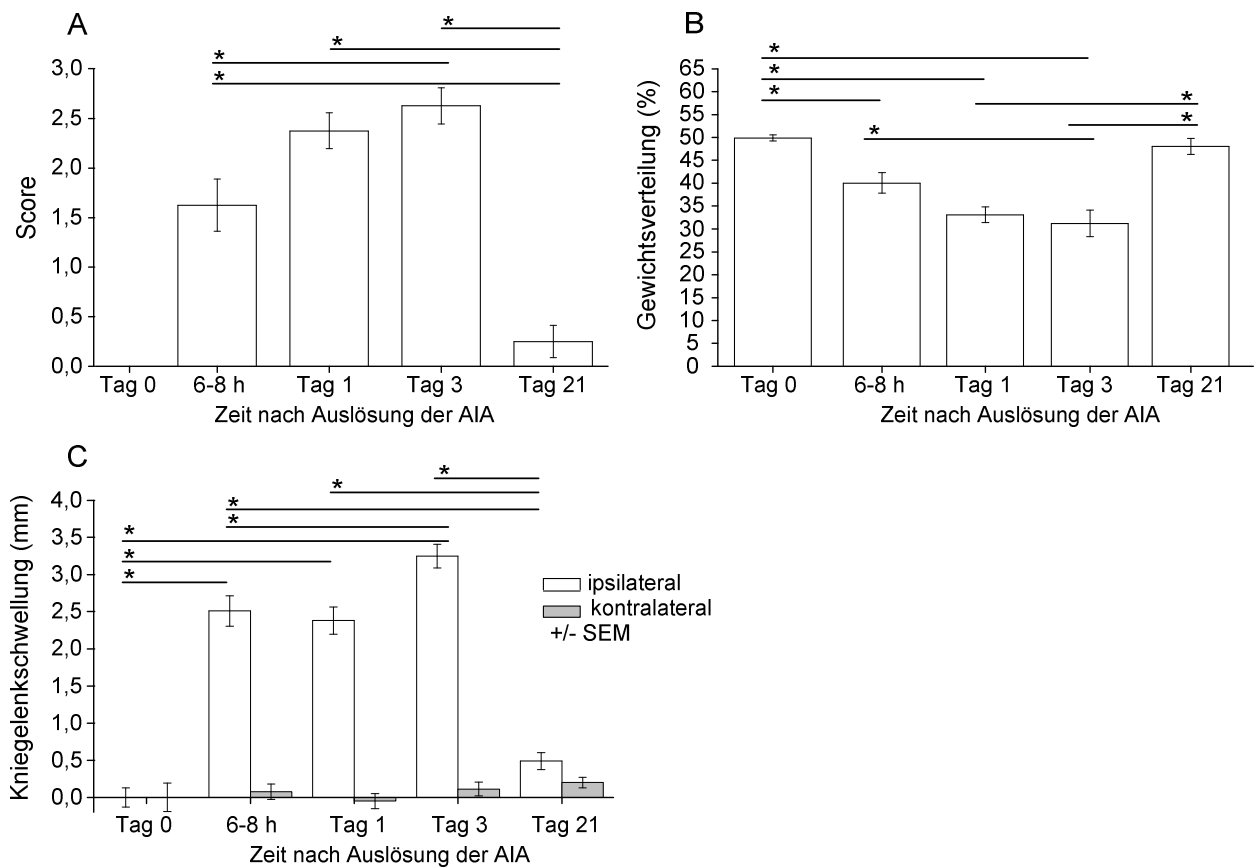
Die mRNA-Expression von IL1-R1 änderte sich nicht im Verlauf der AIA weder ipsilateral noch kontralateral, während die relative mRNA-Expression von IL-1β ipsilateral nach 6-8 h zu Tag 1 und 3 deutlich absank, um sich an Tag 21 wieder dem Expressionsniveau der immunisierten Tiere (Tag 0) zu nähern. Kontralateral stieg die Expression von IL-1β kontinuierlich zu Tag 21 hin an.



### 3.3. Verhaltensversuche an Versuchstieren vor und während einer AIA

Die Versuchstiere für die mRNA-Expressionsstudie wurden vor der Gewebeentnahme Verhaltensversuchen unterzogen. Die verschiedenen Verhaltensversuche wurden unmittelbar vor dem Töten der Tiere an den jeweiligen Versuchstagen durchgeführt sowie an zwei vorherigen Tagen um die Tiere an die Versuchsbedingungen zu gewöhnen (siehe 2.4.).

In Abbildung 3.10 (A) und (B) werden zwei Verhaltensweisen der Versuchstiere dargestellt, die nach Auslösung der AIA entwickelt wurden.



**Abb. 3.10: Schonverhalten und Kniegelenkschwellung der Versuchstiere nach Auslösung der AIA nach 6-8h, an Tag 1, 3 und 21 im Vergleich zu immunisierten Ratten (Tag 0).** (A) zeigt das Schonverhalten der Versuchsratten bei einer sich entwickelnden AIA im linken Knie an. Der Score des Gangbildes wurde wie folgt definiert: 0 = normales Laufverhalten; 1 = Schonung der Hinterpfote nach einer noxischen Kompression des entzündeten Knies; 2 = deutliches Hinken der Ratte während des Laufens; 3 = kein Gebrauch der Hinterpfote mit entzündeten Knie; 4 = keine Fortbewegung. In (B) ist die Gewichtsverteilung in Prozent auf das ipsilaterale Bein dargestellt. (C) zeigt die Änderung des Durchmessers der ipsilateralen entzündeten Knie und der kontralateralen Knie in mm. Anzahl der Versuchstiere zu allen Zeitpunkten  $n = 8$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  im Mittelwertvergleich des Bonferroni-Test.

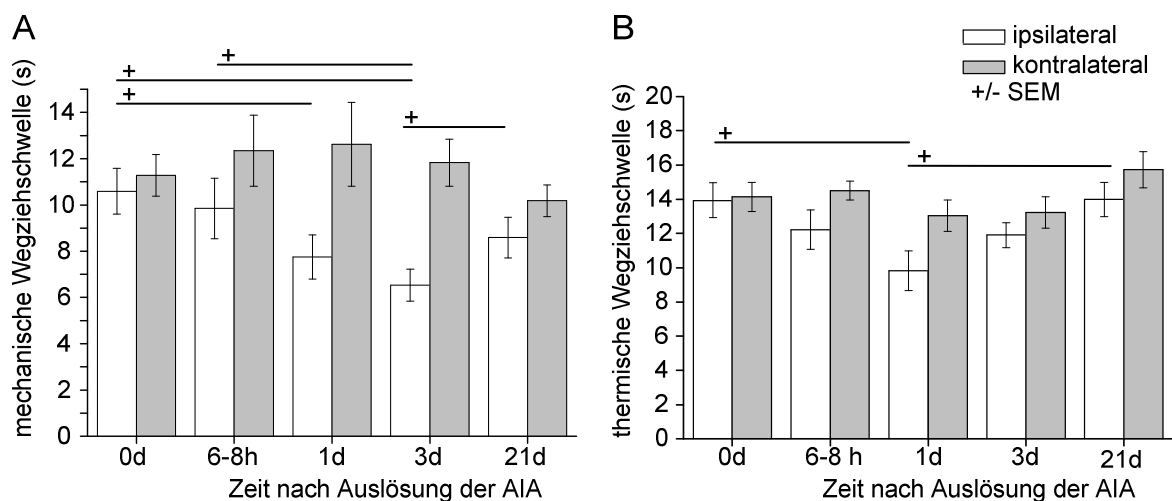
In (A) ist der sog. mittlere *Score* des Laufverhaltens  $\pm$  Standardfehler (siehe Methode 2.4.1.) dargestellt. Immunisierte Tiere zeigten per Definition ein normales Laufverhalten und der *Score* wurde 0 gesetzt (Tag 0 - *Score* = 0). Mit der Entwicklung der AIA veränderte sich das Laufverhalten. Die Ratten schonten ihre Hinterpfoten nach einer noxischen Kompression des entzündeten Knies (*Score* = 1), sie hinkten während des Laufens (*Score* = 2), sie gebrauchten ihre Hinterpfote mit dem entzündeten Knie gar nicht (*Score* = 3) oder sie zeigten keinerlei Fortbewegung mehr (*Score* = 4). Die Tiere entwickelten bereits nach 6-8 h nach Auslösung der AIA (*Score*  $1,6 \pm 0,3$ ) deutliche Veränderungen bei der Fortbewegung, was für eine schnelle Entwicklung einer schmerzhaften Entzündung sprach, die sich am Tag 1 (*Score*  $2,4 \pm 0,2$ ) bis zum Tag 3 (*Score*  $2,6 \pm 0,2$ ) weiter ausprägten. Am Tag 21 (*Score*  $0,3 \pm 0,2$ ) bewegten sich die Ratten wieder nahezu uneingeschränkt. Für die statistische Auswertung konnten nur die Werte nach Auslösung der AIA verwendet werden, da das Laufverhalten aller immunisierten Tiere mit 0 definiert wurde. Die normal verteilten Daten zeigten signifikante Änderungen (\*) im post-hoc Bonferroni-Test ( $p < 0,05$ ). Das zunehmende Laufs Schonverhalten von 6-8 h zu Tag 3 ist mit  $p = 0,009$  signifikant. Das Schonverhalten nahm von 6-8 h bis zum Tag 3 zu und bis zum Tag 21 wieder stark ab ( $p < 0,0001$ ).

Des Weiteren verlagerten die Tiere ihr Körpergewicht während einer sich entwickelnden AIA im ipsilateralen Knie zunehmend auf das gesunde nicht entzündete kontralaterale Bein (siehe Methode 2.4.2.). In Abbildung 3.10 (B) wird die mittlere Gewichtsverteilung  $\pm$  Standardfehler gezeigt. An Tag 0 war das Gewicht gleichmäßig auf beiden Hinterbeinen verteilt und betrug für die ipsilaterale Seite  $49,9\% \pm 0,7\%$ . Nach 6-8 h ging das anteilige ipsilaterale Gewicht auf  $40\% \pm 2,2\%$ , an Tag 1 auf  $33,1\% \pm 1,7\%$  und an Tag 3 auf  $31,2\% \pm 2,9\%$  zurück. An Tag 21 belasteten die Tiere wieder beide Hinterpfoten nahezu gleichmäßig,  $48\% \pm 1,8\%$ . Im post-hoc durchgeführten Bonferroni-Test auf dem 0,05 Signifikanzniveau (\*) hatten die normal verteilten Daten folgende p-Werte,  $p = 0,014$  von Tag 0 zu 6-8 h,  $p < 0,0001$  von Tag 0 zu Tag 1 und Tag 3 sowie von Tag 1 und Tag 3 zu Tag 21 und  $p = 0,036$  von 6-8 h zu Tag 3.

Ein weiteres Maß für die Entwicklung einer arthritischen Entzündung im linken Knie war die Kniegelenkschwellung (siehe Abbildung 3.10 C). Der mittlere Durchmesser  $\pm$  Standardfehler nahm ipsilateral bereits nach 6-8 h um  $2,5 \text{ mm} \pm 0,2 \text{ mm}$  zu. An Tag 1 liegt die durchschnittliche Zunahme bei  $2,4 \text{ mm} \pm 0,2 \text{ mm}$  und an Tag 3 bei  $3,3 \text{ mm} \pm 0,2 \text{ mm}$ . An Tag 21 war die Schwellung wieder fast verschwunden und lag bei  $0,5 \text{ mm} \pm 0,1 \text{ mm}$ . Kontralateral blieb der Durchmesser konstant, lediglich ein kleiner Wachstumszuwachs zu Tag 21 ( $0,2 \text{ mm} \pm 0,1 \text{ mm}$ ) wurde angenommen. Die normal verteilten Daten zeigten signifikante Änderungen (\*) im post-hoc Bonferroni-Test ( $p < 0,05$ ),  $p < 0,0001$  von Tag 0 zu 6-8 h, Tag 1 und Tag 3 so-

wie von 6-8 h, Tag 1, und Tag 3 zu Tag 21,  $p = 0,03$  von Tag 1 zu Tag 3 und  $p = 0,016$  von 6-8 h zu Tag 3.

Neben der unmittelbaren Entzündung und dem Areal mit primärer Hyperalgesie im Knie entwickelten sich in den angrenzenden Geweben, deren spinale Nerven auf die gleichen Rückenmarksegmente projizieren, thermisch und mechanisch überempfindliche Gebiete, sog. sekundäre Hyperalgesien. Um die sekundäre mechanische und thermische Hyperalgesie (siehe Methode 2.4.4.1. und 2.) festzustellen, wurden die entsprechenden Empfindlichkeiten an den Hinterpfoten der Ratten getestet. In Abbildung 3.11 ist die Verschiebung der mittleren mechanischen Wegziehschwelle (A) und der mittleren thermischen Wegziehschwelle (B) in Sekunden  $\pm$  Standardfehler in der planaren Rattenpfote im Verlauf der AIA dargestellt.



**Abb. 3.11: Sekundäre Hyperalgesie an der Rattenpfote nach Auslösung der AIA nach 6-8h, an Tag 1, 3 und 21 im Vergleich zu immunisierten Ratten (Tag 0).** Die mechanische (A) und thermische (B) Hyperalgesie wurde an den Versuchstieren im Verlauf der AIA getestet. In (A) ist die Zeit in Sekunden angegeben, bei der die Ratte die ipsilaterale bzw. kontralaterale Hinterpfote vom Frey Haar-Filament wegzog. In (B) ist die Zeit angegeben, bei der das Versuchstier die ipsilaterale bzw. kontralaterale Hinterpfote bei einem kontinuierlichen Hitzestimulus wegzog. Anzahl der Versuchstiere zu allen Zeitpunkten  $n = 8$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, t-Test unabhängiger Stichproben, + Bonferroni-Holm-Prozedur auf 5%  $\alpha$ -Niveau.

Während die mechanische Wegziehschwelle (A) bei steigendem Druck auf der kontralateralen Seite zu allen Zeitpunkten ungefähr gleich blieb (10,2 s -12,6 s), nahm auf der ipsilateralen Seite die Schwelle bereits nach 6-8 h ( $9,8 \text{ s} \pm 1,4 \text{ s}$ ) ab, um zu Tag 1 ( $7,8 \text{ s} \pm 1 \text{ s}$ ) und Tag 3 weiter kontinuierlich abzusinken. An Tag 3 zogen die Tiere bereits nach  $6,5 \text{ s} \pm 0,7 \text{ s}$  die Hinterpfoten vom Frey Haar-Filament weg, wohingegen sie am Tag 0 erst nach  $10,6 \text{ s} \pm 0,1 \text{ s}$  die Pfoten wegzogen. Am Tag 21 waren die Rattenpfoten nicht mehr so empfindlich, erreichten jedoch nicht wieder den Ausgangswert von Tag 0. Die Tiere zogen bereits nach durch-

schnittlich 8,6 s – 0,9 s die Pfoten vom Filament. Die unabhängigen Stichproben der verschiedenen Zeitpunkte waren normal verteilt. Sie wurden paarweise mit dem t-Test auf ihre Signifikanz (+) getestet und die p-Werte mit der Bonferroni-Holm-Prozedur auf dem 5%  $\alpha$ -Niveau ( $\alpha = 0,05$ ) korrigiert. Die Änderung von Tag 0 zu Tag 1 war mit  $p = 0,0073$ , von Tag 0 zu Tag 3 mit  $p = 0,0006$ , von 6-8 h zu Tag 3 mit  $p = 0,0058$  und von Tag 3 zu Tag 21 mit  $p = 0,013$  signifikant.

In (B) ist die thermische Wegziehschwelle dargestellt. Auf der kontralateralen Seite blieb die Wegziehschwelle auf den Hitzereiz zu allen Zeitpunkten während der AIA gleich und schwankte zwischen 13 s - 15,7 s. Auf der ipsilateralen Seite reagierten die Tiere an der Pfote im Laufe der AIA mit zunehmender Empfindlichkeit. An Tag 0 zogen die Tiere die ipsilaterale Hinterpfote nach 13,9 s – 1 s weg. Die Schwelle nahm schon nach 6-8 h (12,22 s – 1,16 s) ab. An Tag 1 zogen die Ratten die Hinterpfoten nach 9,8 s – 1,2 s von der Hitzequelle weg. Danach stieg die Schwelle wieder an, an Tag 3 auf 11,9 s – 0,7 s um an Tag 21 (14 s – 1 s) wieder den Ausgangswert zu erreichen. Die normal verteilten unabhängigen Stichproben wurden wiederum mit dem t-Test auf Signifikanz (+) überprüft und die p-Werte auf dem 5%  $\alpha$ -Niveau ( $\alpha = 0,05$ ) mit der Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert. So ergab sich eine signifikante Änderung der Wegziehschwelle von Tag 0 zu Tag 1 mit  $p = 0,0016$  und von Tag 1 zu Tag 21 mit  $p = 0,002$ .

Die Verhaltensversuche mit immunisierten Ratten und Ratten mit einer AIA zeigten, dass bereits nach 6-8 h nach AIA-Auslösung Veränderungen im Verhalten der Tiere festzustellen waren, die sich noch verstärkten. In der chronischen Phase am Tag 21 war mehr oder weniger der Zustand vor der AIA wieder erreicht. Auch der Durchmesser des Kniegelenks nahm auf der ipsilateralen Seite in der akuten Phase der AIA zu und näherte sich in der chronischen Phase wieder dem Ausgangswert an. Kontralateral blieb der Durchmesser nahezu konstant.

Ähnlich verhielt es sich bei der Testung der sekundären Hyperalgesie. Die Empfindlichkeit bzw. die Wegziehschwelle der ipsilateralen Pfoten war allerdings erst an Tag 1 deutlich erhöht. Wobei die mechanische Hyperalgesie länger und stärker ausgeprägt war als die thermische Hyperalgesie. Die Empfindlichkeit war an Tag 21 deutlich rückläufig oder wieder auf Tag 0-Niveau. Kontralateral änderten sich die Wegziehschwellen nicht.

#### **4. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Neurone der Spinalganglien mit dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- $\alpha$  interagieren können. Beide TNF-Rezeptoren konnten sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene in den Neuronen der Hinterwurzelganglien nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass 70% der TNFR1-positiven Neurone co-lokalisiert sind mit TRPV1. Da TNFR1 kaum in Neuronen exprimiert wurde, die IB4-positiv waren, spricht das dafür, dass TNFR1 in der Gruppe der peptidergen nozizeptiven Neurone exprimiert wird. Erstmals wurde die Expression der TNF-Rezeptoren an lumbalen Hinterwurzelganglienneuronen auch im Verlauf der experimentellen Mono-Arthritis (AIA-Modell) untersucht. Es wurde dokumentiert, dass sich die Anzahl TNF-Rezeptor-positiven Neurone im Verlauf der Erkrankung nicht signifikant änderte. Allerdings bewirkte die Immunisierung der Ratten an sich (ohne Induktion der Arthritis) eine Abnahme des Anteils TNFR1-positiver Neurone in den Hinterwurzelganglien. Dies weist darauf hin, dass eine systemische Aktivierung des Immunsystems einen Einfluss auf das periphere Nervensystems ausüben kann. Ergänzende *real-time* PCR Experimente zeigten im Wesentlichen das gleiche Ergebnis, außer dass auf der ipsilateralen Seite in der akuten Phase die mRNA-Expression für TNFR1 und TNFR2 signifikant abnahm. Neben den TNF-Rezeptoren wurde auch die Expression des Zytokins TNF- $\alpha$  in den lumbalen Spinalganglien während einer Arthritis im AIA-Modell untersucht. Erstmals konnte gezeigt werden, dass sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene das Zytokin TNF- $\alpha$  nach Induktion einer Arthritis in den ipsi- und kontralateralen Spinalganglienneuronen de novo exprimiert wurde. Dies deutet an, dass die Neurone der Spinalganglien selbst an der Produktion pro-inflammatorischer Zytokinen beteiligt sind und somit „aktiv“ entzündliche und auch nozizeptive Prozesse beeinflussen können.

Außerdem wurde die mRNA-Expressionsänderung von IL1-R1 und IL-1 $\beta$  in lumbalen Spinalganglien durch *real-time* PCR während der AIA untersucht. Während die mRNA-Expression von IL1-R1 beidseitig keine Veränderung zeigt, nahm die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  ipsilateral in der akuten Phase der Arthritis stark ab und stieg kontralateral kontinuierlich an.

Ergänzend zur mRNA-Expressionsstudie wurden Verhaltensversuche mit den Versuchstieren durchgeführt. Mit der erhöhten TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression sowie der TNF- $\alpha$ -Proteinexpression in der akuten Phase der Arthritis zeigten die Tiere eine Verschlechterung ihres Laufverhaltens, eine Körpergewichtsverlagerung auf das gesunde Bein und eine Zunahme des Kniegelenkdurchmessers des entzündeten ipsilateralen Knies. Außerdem trat eine me-

chanische und thermische Hyperalgesie, gemessen an den ipsilateralen Pfoten der Tiere, in der akuten Phase der AIA auf.

#### **4.1. Die TNF-Rezeptoren sind in Neuronen von Spinalganglienschnitten nachweisbar und TNFR1 ist co-lokalisiert mit TRPV1**

Die Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 konnten immunhistochemisch durch Antikörpermarkierungen in ca. 60% der lumbalen L1-L5 Spinalganglien neurone, an Paraffinschnitten von Ganglien gesunder unbehandelter Lewisratten, nachgewiesen werden (Abbildung 3.1). Die Spezifität sowie der Ausschluss von Kreuzreaktivitäten der Antikörper wurden an *tnfr1*<sup>-/-</sup> und *tnfr2*<sup>-/-</sup>-*knockout*-Mäusen (Abbildung 3.3) überprüft. Beide Rezeptoren sind hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich in kleinen bis mittelgroßen Neuronen bis 1000  $\mu\text{m}^2$  exprimiert (Abbildung 3.2), wobei das gesamte Zytosol angefärbt war. Bei der TNFR2-Markierung fällt auf, dass auch in großen Neuronen eine zerstreut, gepunktete Markierung auftritt. Eine geringe schwache Grundexpression beider Rezeptoren wurde in den lumbalen L4 und L5 Spinalganglien neuronen von Ratten auch durch andere Arbeitsgruppen gefunden (Schäfers et al., 2003c; Shubayev und Myers, 2001). Bei Schäfers et al. (2003c) wurde eine zytosolische Anfärbung großer und kleiner Neurone festgestellt. In einer Studie von Shubayev und Myers (2001) wurde gezeigt, dass das Zytosol der großen Neurone und der Zellkern der kleinen Neurone angefärbt wurde. Unterschiedliche Expressionen der TNF-Rezeptoren könnten zum einen durch die verschiedenen Rattenstämme als auch durch unterschiedlich verwendete Antikörper erklärt werden. Da die in dieser Arbeit verwendeten TNFR-Antikörper in *knockout*-Mäusen getestet wurden, spricht dies dafür, dass keine falsch positiven Ergebnisse dokumentiert wurden.

Durch Doppelmarkierungen des TNFR1 mit TRPV1 oder IB4 an Spinalganglienschnitten von Wistarratten sollten die TNFR1-positiven Neurone charakterisiert werden. Ungefähr 46% der Neurone mit positiver TNFR1-Markierung waren vorwiegend in kleinen bis mittelgroßen Neuronen exprimiert (siehe Abb. 3.5). Die Größenverteilung aller Neurone sowie der Neurone mit positiver TNFR1-Markierung entsprach der Verteilung in der Lewisratte. Unterschiede in der absoluten Zahl der Neurone mit TNFR1-Markierung, die die Signifikanzschwelle nicht erreichten, sind vermutlich durch die unterschiedliche Auswahl der Spinalganglien zu erklären. Für die Markierungen in den Wistarratten wurden Spinalganglien aller Rückenmarksegmente verwendet, aus der Lewisratte nur lumbale Spinalganglien.

TNFR1-positive Neurone waren in den Neuronen mit TRPV1 co-lokalisiert (70%), dem Rezeptor für die Aufnahme von noxischen Hitzereizen, aber kaum mit IB4 (17%) (Abbildung 3.4 und 3.5). IB4 ist ein Marker für nicht-peptiderge unmyelinisierte Neurone, für deren postnatale Entwicklung der *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF) notwendig ist (Stucky und Lewin, 1999). Die hier gezeigten Daten lassen erkennen, dass TNFR1 vorwiegend in der peptidergen Neuronengruppe exprimiert wird. TNFR1 sind in einer Neuronengruppe exprimiert, die bei der Schmerzentstehung und der Entwicklung einer Entzündungen eine wichtige Rolle spielen. Denn diese Gruppe nozizeptiver Neurone produzieren z.B. Substanz P und CGRP, die bei der Entstehung einer neurogenen Entzündung eine Rolle spielen, indem es nach der Ausschüttung dieser Neuropeptide aus der Nozizeptorendigung zur Gefäßerweiterung, Flüssigkeitsansammlung im Gewebe und Einwanderung von Entzündungszellen kommt (Schaible et al., 2002; Segond von Banchet et al., 2002; Schaible und Richter, 2004). Neben der peripheren Wirkung im Gewebe haben diese Neuropeptide auch Angriffspunkte in Hinterwurzelganglien und im Rückenmark. CGRP bindet z.B. an seinen Autorezeptor an peptidergen, unmyelinisierten, peripheren Neuronen und bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die Depolarisation der Membran und Erhöhung des  $\text{Na}^+$ -Einstroms der spannungsabhängigen TTX-R  $\text{Na}^+$ -Kanäle (Natura et al., 2005; Segond von Banchet et al., 2002). Der Rezeptor für Substanz P der Neurokinin<sub>1</sub>-Rezeptor wird während einer AIA an Spinalganglienneuronen hochreguliert (Segond von Banchet et al., 2003). Die Neuropeptide können außerdem, die synaptische Übertragung der Erregung durch Glutamat auf Rückenmarksneurone erhöhen, indem sie durch Bindung an ihre G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren die Öffnung der NMDA-Kanäle fördern (Schaible und Schmidt, 2005).

#### **4.2. Die TNF- $\alpha$ -Proteinexpression in den Neuronen erhöht sich an Tag 1 und Tag 3, die mRNA-Expression steigt ipsilateral kurzfristig nach 6-8 h während der AIA an**

Die TNF- $\alpha$ -Proteinexpression in Neuronen wurde durch Antikörpermarkierungen während der AIA dokumentiert. Erste TNF- $\alpha$ -positiv markierte Neurone wurden vereinzelt nach der Immunisierung der Tiere registriert. Die gesunden Kontrolltiere zeigten keine positiven Neurone. Die Anzahl positiver Neurone stieg ipsilateral an Tag 1 und 3 signifikant stark an und wurde auch auf der kontralateralen Seite signifikant an Tag 3 Zeit verzögert hochreguliert. An Tag 21 waren beidseitig nur noch vereinzelt positiv markierte Neurone nachweisbar (Abbildung 3.7 C). Außerdem wurde durch *real-time* PCR die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  im Verlauf der AIA untersucht. Die Expression nahm ipsilateral signifikant lediglich nach 6-8 h

(ca. 14-fach) im Vergleich zur Expression immunisierter Tiere zu (Abbildung 3.8 B). Auffällig war auch eine signifikante Expressionsänderung auf der kontralateralen Seite an Tag 21 (13-fach).

Eine TNF- $\alpha$ -Proteinexpression in den Spinalganglien gesunder Ratten wurde in verschiedenen Veröffentlichungen gezeigt. Dabei wurde auch eine TNF- $\alpha$ -Expression in neuronalen Zellen dokumentiert (Schäfers et al., 2002; Shubayev und Myers, 2001). In den eigenen Untersuchungen wurden in den Spinalganglien normaler Ratten keine Neurone gefunden, die TNF- $\alpha$  exprimieren. Die Proteinexpression von TNF- $\alpha$  in Hinterwurzelganglienneuronen bei einer AIA wurde in dieser Arbeit erstmals untersucht. Eine Hochregulation von maximal 16% TNF- $\alpha$ -positiver Neurone konnte an Tag 1 und Tag 3 nach AIA-Auslösung festgestellt werden. Die TNF- $\alpha$ -positiven Neurone an Tag 1 und Tag 3 schienen vorwiegend kleine bis mittelgroße Neurone zu sein.

Eine Untersuchung im Nervenligationsmodell durch CCI zeigte in Ratten vier Tage nach der Ligation ipsilateral eine Hochregulation TNF- $\alpha$ -positiver Neurone mit einem größeren Anteil mittelgroßer und großer Neurone (Schäfers et al., 2003a).

Durch eine Stimulierung des Immunsystems mit Lipopolysacchariden (LPS) konnte immunhistochemisch keine TNF- $\alpha$ -Proteinexpression in Neuronen nachgewiesen werden, allerdings wurde 3 h nach LPS-Stimulierung in nicht-neuronalen Zellen, vorwiegend in aktivierten Monocyten/Makrophagen, TNF- $\alpha$  nachgewiesen (Li et al., 2004a). In der vorliegenden Arbeit wurde keine TNF- $\alpha$ -Markierung an nicht-neuronalen Zellen registriert. Neue Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass an Tag 3 nach Auslösung der AIA die Anzahl ED1<sup>+</sup>-positiver Zellen in den lumbalen ipsilateralen und kontralateralen Spinalganglien erheblich zunahm und am Tag 21 wieder auf das Niveau immunisierter Tiere absank (Segond von Banquet et al, 2009). Es waren also aktivierte Makrophagen und Monocyten in lumbalen Spinalganglien vorhanden. Ob und in welchem Umfang diese Makrophagen TNF- $\alpha$  exprimierten war nicht feststellbar. Eventuell war die TNF- $\alpha$ -Ausschüttungsrate bzw. die *turnover*-Rate sehr hoch, sodass durch Antikörpermarkierung TNF- $\alpha$  nicht nachweisbar war. Auch die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression während der AIA wurde erstmalig in Spinalganglien untersucht. Die ipsilaterale mRNA-Expressionszunahme von TNF- $\alpha$  nach 6-8 h im Spinalganglion kann mit der Zunahme der Proteinexpression an Tag 1 und Tag 3 nach AIA-Induktion in Verbindung gebracht werden. Ob die kontralaterale mRNA-Expressionszunahme von TNF- $\alpha$  am Tag 21 auch mit einer Zunahme der Proteinexpression im späteren Verlauf der AIA steht, kann lediglich vermutet werden. In einer anderen Studie von Pohlers et al. (2005) wurde durch *real-time* PCR die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression während einer AIA an Ratten in der entzündeten Synovi-



almembran gemessen. Die mRNA-Expression lag teilweise 2-6-fach über der Expression durch Immunisierung obwohl es keinen signifikanten Anstieg gab. Auch wurde durch ELISA-Experimente (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) gezeigt, dass in der Synovialmembran die TNF- $\alpha$ -Proteinkonzentration ebenfalls 6 h nach Auslösung der AIA auf das 5-fache anstieg. Es kann vermutet werden, dass TNF- $\alpha$  zum Teil auch retrograd vom entzündeten Knie zu den Spinalganglienneuronen transportiert wird, ähnlich wie nach einer CCI bei Schäfers et al. (2003a). Auch im CCI-Nervenligationsmodel wurde eine Erhöhung der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression in den frühen Stadien der Nervenverletzung nachgewiesen (Lee et al., 2004; Sacerdote et al., 2008).

TNF- $\alpha$  als pro-inflammatorisches Zytokin wird nach Verletzungen und Entzündungen produziert und sezerniert (Sommer und Kress, 2004) und hat bekanntermaßen Einfluss auf die Entstehung von Schmerz, wie Hyperalgesie und Allodynie. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass gleichzeitig mit der erhöhten TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression (nach 6-8 h) und der TNF- $\alpha$ -Proteinexpression (an Tag 1 und Tag 3 der AIA) die Tiere eine Verschlechterung ihres Laufverhaltens, eine Körpergewichtsverlagerung auf das gesunde Bein und eine Zunahme des Kniegelenkdurchmessers des entzündeten ipsilateralen Knies vorwiesen (Abbildung 3.10). Außerdem nahm an der ipsilateralen Pfote die mechanische Wegziehschwelle an Tag 1 und Tag 3 sowie die thermische Wegziehschwelle an Tag 1 signifikant ab (Abbildung 3.11). Beides ist ein Maß für die sekundäre Hyperalgesie. An Tag 21 erreichten fast alle Werte wieder das Niveau der immunisierten Ratten. In der AIA-Studie von Böttger et al. (2008) konnte durch die wiederholte Gabe des TNF- $\alpha$  neutralisierenden Medikaments Etanercept gezeigt werden, dass sowohl die Verschlechterung des Laufverhalten als auch die Schwellung des Kniegelenkdurchmessers abgemildert wurde. Auch die thermische Wegziehschwelle der Pfote (sekundäre thermische Hyperalgesie) erhöhte sich wieder und die primäre mechanische Hyperalgesie des Knies ging schneller zurück. Elektrophysiologische Ableitungen an C-Fasern des entzündeten Knies von Ratten nach dreitägiger AIA zeigten eine geringere Aktionspotentialfrequenz ca. 60 min nach Etanerceptgabe auf noxische aber auch auf nicht-noxische mechanische Reize. In Kontrollratten und immunisierten Ratten wurde dieser Effekt nicht gefunden. Es kann deshalb angenommen werden, dass TNF- $\alpha$  bei einer AIA aktivierend auf nozizeptiven Fasern, wirkt. Dafür spricht auch eine weitere Untersuchung in unserer Arbeitsgruppe, die gezeigt hat, dass durch 24- bzw. 48-stündige Zugabe von TNF- $\alpha$  zu einer Neuronenkultur aus Spinalganglien der Anteil der Neurone mit positiver TRPV1-Markierung signifikant zunahm (Hensellek et al. 2008). Dies könnte die Grundlage für die noxisch-thermische Sensibilisierung der Neurone sein. Allerdings nahm die Anzahl der Neurone in lumbalen Spinalganglien-

schnitten mit positiver TRPV1-Markierung 3 Tage bzw. 21 Tage nach Auslösung der AIA nicht zu im Vergleich zu unbehandelten Ratten (Bär et al. 2004). Diese konträren Aussagen können zum einen mit den verschiedenen Zeitpunkten der Markierung zu tun haben, wahrscheinlich ist es jedoch ein Hinweis, dass im Tiermodell neben TNF- $\alpha$  auch andere pro- und anti-inflammatorische Mediatoren eine Rolle spielen.

Auch im arthritischen CFA-Modell konnte gezeigt werden, dass sowohl die Pfotenschwellung als auch die primäre thermische und mechanische Hyperalgesie durch Etanerceptgabe vor der Entwicklung der Entzündung abgemildert wurde (Inglis et al., 2005). CFA-Injektion in die Rattenpfote bewirkte eine deutliche Reduzierung der mechanischen und thermischen Wegziehschwelle innerhalb von 3 h, die bis zum Tag 15 anhielt. Auf der anderen Seite bewirkte eine Injektion von 500 ng TNF- $\alpha$  einen deutlichen Rückgang der Wegziehschwellen innerhalb von 3-6 h, wobei der Effekt nach 48 h verschwunden war (Woolf et al., 1997).

Auch in Beispielen von Ligationsmodellen wurde ein Zusammenhang zwischen TNF- $\alpha$  und Hyperalgesie festgestellt. Die Ligation eines Nervens ist ein Modell für den neuropathischen Schmerz, der bei Verletzung des Nervens selbst und nicht des umliegenden Gewebes wie bei einer Entzündung entsteht. Schäfers et al. (2003b) zeigte, dass eine konzentrationsabhängige Injektion von TNF- $\alpha$  in das Spinalganglion der Ratte die mechanische Wegziehschwelle der Pfote erniedrigte. Der Effekt wurde erhöht wenn der dazugehörige Spinalnerv abgeschnürt wurde (SNL-Modell). Bei der CCI in Ratten nahm die mechanische Allodynie schon ab Tag 1 bis zum Tag 7 zu und blieb bis zum Tag 28 erhöht. Die thermische Hyperalgesie nahm auch an Tag 1 bis zum Tag 7 zu und blieb bis zum Tag 28 erhöht (Lee et al., 2004). Auch bei einer CCI in der Maus wurde festgestellt, dass mit der frühen TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression im geschädigten Spinalnerv nach 6 h sowie am Tag 1 und Tag 3 bereits eine thermische Hyperalgesie und mechanische Allodynie auftrat, die bis zum Tag 14 anhielt (Sacerdote et al., 2008). Die zitierten Arbeiten zeigten einen Zusammenhang zwischen der Produktion von TNF- $\alpha$  bei einer Entzündung oder Verletzung eines Nerven und der Entstehung von Schmerzen insbesondere primäre Hyperalgesien und Allodynie. Dabei scheint TNF- $\alpha$  besonders bei dem frühzeitigen Auftreten von Schmerzen bis zu 2-3 Tagen wichtig zu sein. Für die chronische Schmerzphase scheinen andere Faktoren wichtiger zu werden.

#### **4.3. Die TNF-Rezeptorproteinexpression ändert sich während der AIA nicht, die mRNA-Expression dagegen zeigt Veränderungen im ipsilateralen Spinalganglion**

Die Expression beider TNF-Rezeptoren wurde an Spinalganglien erstmals auf Proteinebene durch Antikörpermarkierungen als auch auf mRNA-Ebene durch *real-time* PCR während der AIA untersucht. Die TNFR1-Proteinexpression im AIA-Modell zeigte eine gleich bleibende schwächere Expression im Vergleich zur Grundexpression in den Kontrollratten. TNFR1-Markierungen an Spinalganglien-neuronen unbehandelter Ratten zeigten beidseitig eine ca. 15% höhere TNFR1-Expression als bei immunisierten Ratten oder Ratten während der AIA (Abbildung 3.6 A). Durch *real-time* PCR-Experimente wurde die mRNA-Expression des TNFR1 nachgewiesen. Die Änderung der mRNA-Expression im Verlauf der AIA wurde auf die Expression in immunisierten Ratten bezogen. Die relative mRNA-Expression von TNFR1 sank ipsilateral und - weniger ausgeprägt - kontralateral nach Auslösung der AIA nach 6-8 h und weiter zu Tag 1 hin ab um am Tag 21 nahezu die mRNA-Expression der immunisierten Tiere wieder zu erreichen. Die geringere ipsilaterale Expression an Tag 1 (2,5-fach) erreichte Signifikanz (Abbildung 3.8 A). Auffällig war, dass ipsilateral auch bei der TNFR1-Proteinexpression am Tag 1 der niedrigste Anteil positiver Zellen gezählt wurde, der nicht signifikant war, aber eine Tendenz andeutet.

Die Immunisierung der Ratten hatte im verwendeten Arthritismodell Einfluss auf die Anzahl TNFR1-positiver Zellen in den Spinalganglien. Somit scheint eine systemische Aktivierung des Immunsystems Einfluss auf das periphere Nervensystem nehmen zu können. Bei einer Immunstimulierung mit LPS wurde nach 6 h mit *real-time* PCR und *northern-blot* Analyse eine erhöhte mRNA-Expressionrate von TNFR1 festgestellt. Wobei durch *in situ* Hybridisierung gezeigt wurde, dass eher die mRNA-Transkripte pro Neuron erhöht waren als die Anzahl der Neurone an sich (Li et al., 2004).

Bei einem weiteren Arthritismodell, der CFA-Arthritis, wurde durch *real-time* PCR in unbehandelten Ratten eine moderate TNFR1-Expression in L5 Spinalganglien nachgewiesen, dessen Expression war nach CFA-Auslösung ipsilateral und kontralateral an Tag 3 und Tag 7 ca. dreifach erhöht. Auch die *in situ* Hybridisierung zeigte in neuronalen Zellen an Tag 3 und Tag 7 mRNA-Transkripte (Inglis et al., 2005).

Die TNFR1-Expression wurde auch in verschiedenen Ligationsmodellen untersucht. Dabei wurde gefunden, dass die Proteinexpression des TNFR1 in der frühen Phase dieser neuropathischen Modelle hoch reguliert wurde (Schäfers et al., 2003c; Shubayev und Myers, 2001) und

auch die mRNA-Expression gegenüber unbehandelten Ratten leicht erhöht war (Lee et al., 2004).

Die Anzahl TNFR2-positiver Neurone in Spinalganglien war nach Antikörpermarkierung beidseitig bei Kontrollratten, immunisierten Tieren und den Ratten nach Auslösung der AIA zu allen Zeitpunkten nahezu gleich (Abbildung 3.6 B). Durch *real-time* PCR wurde die mRNA-Expression des TNFR2 im Verlauf der AIA untersucht. Die Expression nahm - im Vergleich zur Expression immunisierter Tiere - am Tag 1 ipsilateral signifikant (ca. 2,5-fach) ab (Abbildung 3.7 C). Die mRNA-Expression änderte sich beidseitig zu allen anderen Zeitpunkten nicht wesentlich.

Bei der Arthritis im CFA-Modell nahm die TNFR2-mRNA-Expression nach Auslösung der Entzündung ipsilateral an Tag 7 um das 5-fache der Grundexpression zu, kontralateral gab es nur eine moderate Expressionserhöhung. Durch immunhistochemische Doppelmarkierungen von TNFR2 und ED1 (Marker für aktivierte Makrophagen und Monocyten) konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expressionsänderung im Verlauf der CFA vorwiegend durch die Einwanderung von aktivierten Makrophagen und Monocyten in das ipsilaterale Spinalganglion zurückzuführen war (Inglis et al., 2005). Auch die Erhöhung der mRNA-Expression 3 h nach LPS-Stimulierung des Immunsystems von Ratten war auf nicht-neuronale Zellen im Spinalganglion zurückzuführen (Li et al., 2004b).

In Nervenligationsmodellen wurde gefunden, dass die Anzahl TNFR2-positiver Neurone, vor allem kleiner Neurone, zunahm (Schäfers et al., 2003c; Shubayev und Myers, 2001) und auch auf mRNA-Ebene wurde eine Expressionserhöhung gefunden (Lee et al., 2004).

Die Untersuchungen zur Expression der TNF-Rezeptoren in Spinalganglien auf Protein- und mRNA-Ebenen in den verschiedenen Modellen zeigte, dass die Expression in der AIA einen anderen Verlauf als in anderen Entzündungsmodellen oder neurophatischen Modellen (Ligation) nahm. Eine aktuelle Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass keine Antikörpermarkierung des *activating transcription factor-3* (ATF-3) im Zellkern der Neurone nach AIA-Auslösung gefunden wurde (Segond von Banchet et al, 2009). ATF-3 ist ein Marker, der Nervenschädigungen anzeigt. In einem weiteren Arthritismodell, der durch CFA-Injektion ausgelösten Polyarthritis, gab es zumindest teilweise ATF-3-positive Neurone, sodass von einer, wenn auch geringen, Nervenschädigung auszugehen ist (Inglis et al., 2005). Auch bei einer systemisch ausgelösten Kollagen-induzierten Arthritis in Mäusen wurden einige ATF-3-positive Neurone gezählt (Inglis et al., 2007). Durch die AIA wurde also keine Nervenschädigung verursacht, dies unterscheidet sie von allen anderen Arthritismodellen. Es kann deshalb

vermutet werden, dass die Hochregulation der TNF-Rezeptoren in den anderen Arthritismodellen sowie in den Ligationsmodellen durch die Nervenschädigung verursacht wird.

#### **4.4. Die IL1- $\beta$ -mRNA-Expression sinkt ipsilateral stark ab und steigt kontinuierlich kontralateral an, während die IL1-R1-Expression sich nicht in der AIA ändert**

Da die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  häufig in der Literatur in ähnlichen Zusammenhängen beschrieben werden, wurde erstmals auch die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  und des IL1-Rezeptors1 (IL1-R1) durch *real-time* PCR in Spinalganglien während der AIA untersucht (Abbildung 3.9). Bezogen auf die mRNA-Expression immunisierter Ratten sank ipsilateral die IL-1 $\beta$ -Expression signifikant nach 6-8 h an Tag 1 und 3 (8-fach), um an Tag 21 nahezu die Grundexpression immunisierter Tiere wieder zu erreichen. Kontralateral stieg die mRNA-Expression signifikant. Bis zum Tag 21 zeigte sie einen kontinuierlichen Anstieg auf das ca. 4-fache der Grundexpression. Die mRNA-Expression des IL1-R1 verblieb ipsilateral und kontralateral auf Höhe der Grundexpression immunisierter Tiere. Am Institut wurden auch Antikörpermarkierungen des IL1-R1 an Paraffinschnitten von Spinalganglien durchgeführt. Die unveröffentlichten Daten zeigten beidseitig bei Kontrolltieren 25% IL1-R1-positive Neurone, durch Immunisierung stieg der Wert auf 40% und im Verlauf der AIA kontinuierlich bis auf 55% an Tag 21 nach AIA-Induktion an.

Andere Arbeiten mit anti-IL-1 $\beta$  Markierungen zeigten, dass ca. 65% aller Neurone IL-1 $\beta$ -positiv waren, wobei es sich vorwiegend um mittelgroße bis große und weniger um kleine Neurone handelte (Coprav et al., 2001). Auch *in situ* Hybridisierungen zeigten in ca. 70% der Neurone eine mRNA-Expression. Ebenfalls wurde durch *in situ* Hybridisierung gezeigt, dass alle kleinen und großen sensorischen Neurone, sowie einige Glia-ähnliche Zellen (vorwiegend Satellitenzellen) IL-R1-mRNA exprimieren (Coprav et al., 2001). Das gemeinsame Vorkommen von IL-1 $\beta$  und IL-R1 weist auf eine autokrine/parakrine Funktion von IL-1 $\beta$  in Spinalganglien hin.

Auffällig in dieser Arbeit war die reduzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  im ipsilateralen Spinalganglion an den Tagen 1 und 3. Die mRNA-Expression sagt letztlich nichts über die tatsächliche Proteinkonzentration aus, es ist aber anzunehmen, dass auch diese abnahm. In der Literatur konnten keine ähnlich gelagerten Untersuchungen bei verschiedenen Entzündungsmodellen oder neurophatischen Modellen gefunden werden. In entzündeten Synovialmembranen (AIA-Modell) nahm die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression (ca. 450-fach) als auch die Proteinexpression (ca.15-fach) nach 6 h deutlich zu, um dann wieder deutlich abzufallen (Pohlers et al.,

2005). Die Expression von IL-1 $\beta$  wurde in Spinalganglien ansonsten nur noch in Nervenligationsmodellen untersucht. Im CCI-Model in Ratten nahm die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression der lumbalen Spinalganglien (L4-L6) gegenüber unbehandelten Ratten an Tag 1 ca. 6-fach zu und fiel an Tag 14 wieder auf das Niveau unbehandelter Ratten zurück. Auch die mRNA-Expression des IL1-R1 nahm gegenüber unbehandelten Ratten im neuropathischen Modell signifikant an Tag 3 und Tag 7 1,5-fach zu und fiel an Tag 14 wieder auf das Niveau unbehandelter Ratten zurück (Lee et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine kontinuierliche Steigerung der mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  auf der kontralateralen Seite festgestellt. Kleinschnitz et al. (2005) untersuchte bei einer Nervenligation durch CCI die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  in den kontralateralen lumbalen Spinalganglien (L4-L6) und dem kontralateralen unverletzten Nerven in Mäusen. Die Expression änderte sich in den Ganglien nicht, stieg aber im unverletzten Nerven an Tag 1 ca. 12-fach an und blieb auch bis zum Tag 28 erhöht (ca. 2,5 -fach). Die ipsilaterale IL1- $\beta$ -Expression war im Nerven an Tag 3 ca. 60-fach erhöht. Durch eine Blockierung des NMDA-Rezeptors, der Glutamaterezeptor, der bei einer noxischen Reizung postsynaptische Membranen zusätzlich depolarisiert (siehe Abschnitt 1.1.3.), wurde die Erhöhung der IL-1 $\beta$ -Expression auf der kontralateralen Seite unterdrückt. Für diesen Effekt scheinen spinale Übertragungsmechanismen eine Rolle zu spielen.

Es gibt Hinweise, dass TNF- $\alpha$  eine wesentliche Rolle bei der IL-1 $\beta$ -Produktion auf der kontralateralen Seite und der Entstehung von Schmerzen und Entzündungen spielt. Bei Russell et al.(2009) wurde nach TNF- $\alpha$  Injektion in eine Mauspfote beidseitig eine thermische Hyperalgesie nach 1 h registriert, die nach 6 h wieder verschwunden war. Mit der TNF- $\alpha$ -Injektion stieg ipsilateral die IL-1 $\beta$ -Proteinkonzentration in der Pfote kontinuierlich nach 1 h bis zu 6 h an. Kontralateral wurde nach 1 h und 2 h IL-1 $\beta$  gemessen, wenn auch in einer geringeren Konzentration. Wurde der IL1-Rezeptorantagonist zusammen mit TNF- $\alpha$  in die Mauspfote injiziert waren in beiden Pfoten die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen reduziert und kontralateral war keine Hyperalgesie nachweisbar. Solche bilateralen Effekte sind auch bekannt bei rheumatoider Arthritis des Menschen (Zangger et al., 2005), und traten auch im Tiermodell auf, z.B. die Entwicklung einer bilateralen Hyperalgesie auf Hitzereize nach der Injektion von unvollständigem Freund's Adjuvans in das Rattenknie (Kidd et al., 1995; Rees et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit waren TNF- $\alpha$ -positive Neurone ipsilateral (Tag 1 und Tag 3) und kontralateral (Tag 3) vorhanden. Eventuell spielt IL-1 $\beta$  bei der Entstehung von Schmerzen und Entzündungen auf der kontralateralen Seite eine Rolle, obwohl in dieser Arbeit kein solcher Effekte bis zum Tag 21 nach AIA-Auslösung registriert wurde.

#### **4.5. Schlussfolgerung und Ausblick**

Die vorliegende Arbeit hat deutlich gemacht, dass im Modell der Antigen-induzierten Arthritis wichtige pro-inflammatorische Zytokine und deren Rezeptoren anders reguliert werden als in anderen Arthritis-Modellen. Die AIA ist eine immunologisch induzierte Arthritis, die im Gegensatz zur CFA- und Collagen-induzierten Arthritis nicht mit neuronalen Schädigung verbunden ist, und sich so auch deutlich von neuropathischen Modellen unterscheidet. Unter diesem Aspekt sollten auch die Ergebnisse dieser Arbeit betrachtet werden, besonders die immunhistochemischen Markierungen der TNF-Rezeptoren. Die Untersuchungen zur Expression der TNF-Rezeptoren in Spinalganglien auf Protein- und mRNA-Ebene zeigte, dass die Expression in der AIA auf Proteinebene stabil und auf mRNA-Ebene eher absinkt, während es in anderen Modellen zur Zunahme der Expression der TNF-Rezeptoren kommt. Die Aktivierung des Immunsystems an sich, bewirkte außerdem eine Verminderung der Anzahl positiver Neurone mit TNFR1-Markierung.

Aus dieser Arbeit und auch anderen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergeben sich weitere Fragestellungen. Durch eine retrograde Markierung der Neurone, die das Rattenknie sensorisch versorgen, könnten die Neurone mit positiver TNF-Rezeptor- oder TNF- $\alpha$ -Markierung lumbaler Spinalganglien weiter charakterisiert und die Frage beantwortet werden, ob sich TNF- $\alpha$  oder seine Rezeptoren in den Afferenzen aus dem Kniegelenk ändert. Zudem könnte eine quantitative Bestimmung der Proteinmenge von Zytokinrezeptoren in den Neuronen aus dem Kniegelenk interessant sein.

In dieser Arbeit wurde auf mRNA-Ebene festgestellt, dass die Expression von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in den kontralateralen Spinalganglien an Tag 21, also in der chronischen Phase der Arthritis, zunahm. Im diesem Zusammenhang könnte man die Expression auf mRNA- und Proteinebene nach Tag 21 untersuchen. Insbesondere IL-1 $\beta$  spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung bilateraler Effekte. IL-1 $\beta$  scheint die Übertragung einer Entzündung auf die gesunde Seite über das Rückenmark zu beeinflussen.

In der akuten Phase der AIA kam es sowohl ipsi- als auch kontralateral zur Einwanderung aktivierter Makrophagen. Es sollte untersucht werden wann und zu welchem Zeitpunkt diese Makrophagen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder auch anti-inflammatorische Zytokine ausschütten.

Insgesamt wäre es wünschenswert das AIA-Modell für die Untersuchung von Prozessen der chronischen Phase der Arthritis nach dem Tag 21 auszubauen oder auch „rheumatische Schübe“ zu simulieren umso einerseits die Chronifizierung von Schmerzen und andererseits die klinisch relevante Phase des chronischen Schmerzes besser zu verstehen.

## **5. Literatur**

Amaya, F., Shimosato, G., Nagano, M., Ueda, M., Hashimoto, S., Tanaka, Y., Suzuki, H. and Tanaka, M., 2004. NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. *Eur J Neurosci*, 20:2303-2310.

Akira, S. and Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews*, 4:499-511.

Alessandri-Haber, N., Dina, O. A., Joseph, E. K., Reichling, D. B. and Levine, J. D. 2008. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *J Neurosci*, 28:1046-1057.

Baker, M. D. and Wood, J. N., 2001. Involvement of Na<sup>+</sup> channels in pain pathways. *Trends Pharmacol Sci*, 22:27-31.

Bang, H., Egerer, K., Gauliard, A., Luthke, K., Rudolph, P. E., Fredenhagen, G., Berg, W., Feist, E. and Burmester, G. R., 2007. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 56:2503-2511.

Bär, K. J., Schaible, H. G., Brauer, R., Halbhüser, K. J. and von Banchet, G. S., 2004. The proportion of TRPV1 protein-positive lumbar DRG neurones does not increase in the course of acute and chronic antigen-induced arthritis in the knee joint of the rat. *Neurosci Lett*, 361:172-175.

Bär, K. J., Schurigt, U., Scholze, A., Segond von Banchet, G., Stopfel, N., Brauer, R., Halbhüser, K. J. and Schaible, H. G., 2004. The expression and localization of somatostatin receptors in dorsal root ganglion neurons of normal and monoarthritic rats. *J Neurosci*, 24:197-206.

Bendele, A., 2001. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interac*, 1:377-385.

Beutler, B. and Cerami, A., 1988. The history, properties, and biological effects of cachectin. *Biochemistry*, 27:7575-7582.

Binshtok, A. M., Wang, H., Zimmermann, K., Amaya, F., Vardeh, D., Shi, L., Brenner, G. J., Ji, R. R., Bean, B. P., Woolf, C. J. and Samad, T. A., 2008. Nociceptors are interleukin-1 $\beta$  sensors. *J Neurosci*, 28:14062-14073.

Black, J. A., Liu, S. J., Tanaka, M., Cummins, T. R. and Waxman, S. G., 2004. Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain*, 108:237-247.

Böttger, M. K., Hensellek, S., Richter, F., Gajda, M., Stockigt, R., Segond von Banchet, G., Brauer, R. and Schaible, H. G., 2008. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor  $\alpha$  neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum*, 58:2368-2378.

Cheng, J. K. and Ji, R. R., 2008. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res*, 33:1970-1978.



- Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987. Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction. *Anal Biochem*, 162:156-159.
- Copray, J.C., Mantingh, I., Brouwer, N., Biber, K., Kust, B.M., Liem, R.S., Huitinga, I., Tilders, F.J., Van Dam, A.M. and Boddeke, H.W., 2001. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *J Neuroimmunol*, 118:203-211.
- Coste, J., Voisin, D. L., Luccarini, P. and Dallel, R., 2008. A role for wind-up in trigeminal sensory processing: intensity coding of nociceptive stimuli in the rat. *Cephalalgia*, 28:631-639.
- Cunha, F. Q., Poole, S., Lorenzetti, B. B. and Ferreira, S. H., 1992. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 107:660-664.
- Dinarello, C. A., 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87:2095-2147.
- Dinarello, C. A., Cannon, J. G., Wolff, S. M., Bernheim, H. A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I. S., Palladino, M. A., Jr. and O'Connor, J. V., 1986. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med*, 163:1433-1450.
- Dinarello, C. A., Ikejima, T., Warner, S. J., Orencole, S. F., Lonnemann, G., Cannon, J. G. and Libby, P., 1987. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol*, 139:1902-1910.
- Erickson, S. L., Desauvage, F. J., Kikly, K., Carvermoore, K., Pittsmeek, S., Gillett, N., Sheehan, K. C. F., Schreiber, R. D., Goeddel, D. V. and Moore, M. W., 1994. Decreased Sensitivity to Tumor-Necrosis-Factor but Normal T-Cell Development in Tnf Receptor-2-Deficient Mice. *Nature*, 372:560-563.
- Fantuzzi, G. and Dinarello, C. A., 1999. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol*, 19:1-11.
- Ferreira, S. H., Lorenzetti, B. B., Bristow, A. F. and Poole, S., 1988. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, 334:698-700.
- Follenfant, R. L., Nakamura-Craig, M., Henderson, B. and Higgs, G. A., 1989. Inhibition by neuropeptides of interleukin-1 beta-induced, prostaglandin-independent hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 98:41-43.
- Grech, A. P., Gardam, S., Chan, T. N., Quinn, R., Gonzales, R., Basten, A. and Brink, R., 2005. Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) signaling is negatively regulated by a novel, carboxyl-terminal TNFR-associated factor 2 (TRAF2)-binding site. *J Biol Chem*, 280:31572-31581.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P., 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 83:793-802.

Haas, E., 1999. Autotrope Signaltransduktion durch membranständigen Tumor-Nekrose-Faktor (TNF). *Dissertation*.

Haas, E., Grell, M., Wajant, H. and Scheurich, P., 1999. Continuous autotropic signaling by membrane-expressed tumor necrosis factor. *J Biol Chem*, 274:18107-18112.

Hensellek, S., Brell, P., Schaible, H.-G., Brauer, R. and Segond von Banchet, G., 2007. The cytokine TNF[alpha] increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Mol Cell Neurosci*, 36:381-391.

Inglis, J. J., Nissim, A., Lees, D. M., Hunt, S. P., Chernajovsky, Y. and Kidd, B. L., 2005. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*, 7:807-816.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M., 2002. Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag, GmbH* 5.

Xiaochun Jin and Robert W. Gereau IV, 2006. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci*, 26:246–255

Kapitany, A., Zilahi, E., Szanto, S., Szucs, G., Szabo, Z., Vegvari, A., Rass, P., Sipka, S., Szegedi, G. and Szekanecz, Z., 2005. Association of rheumatoid arthritis with HLA-DR1 and HLA-DR4 in Hungary. *Ann Ny Acad Sci*, 1051:263-270.

Kleinschnitz, C., Brinkhoff, J., Sommer, C. and Stoll, G., 2005. Contralateral cytokine gene induction after peripheral nerve lesions: dependence on the mode of injury and NMDA receptor signaling. *Brain Res Mol Brain Res*, 136:23-28.

Korb, A., Pavenstadt, H. and Pap, T., 2009. Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis*, 14:447-454.

Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I. and Lu, S. D., 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, 53:45-53.

Li, Y., Ji, A., Weihe, E. and Schafer, M. K., 2004. Cell-specific expression and lipopolysaccharide-induced regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNF receptors in rat dorsal root ganglion. *J Neurosci*, 24:9623-9631.

Liu, M., Willmott, N.J., Michael, G.J. and Priestley, J.V., 2004. Differential pH and capsaicin responses of Griffonia simplicifolia IB4 (IB4)-positive and IB4-negative small sensory neurons. *Neuroscience*, 127:659-672.

Maier, J. A., Hla, T. and Maciag, T., 1990. Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 265:10805-10808.

Mattson, M. P., 2005. NF-kappa B in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem Res*, 30:883-893.

- McCleskey, E. W. and Gold, M. S., 1999. Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol*, 61:835-856.
- McDougall, J. J., Watkins, L. and Li, Z., 2006. Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a modulator of joint pain in a rat model of osteoarthritis. *Pain*, 123:98-105.
- Moriguchi, T., Toyoshima, F., Masuyama, N., Hanafusa, H., Gotoh, Y. and Nishida, E., 1997. A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses. *EMBO J*, 16:7045-7053.
- Moss, M. L., Jin, S. L., Becherer, J. D., Bickett, D. M., Burkhart, W., Chen, W. J., Hassler, D., Leesnitzer, M. T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton, T., Schoenen, F., Warner, J. and Willard, D., 1997. Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol*, 72:127-129.
- Natura, G., Second von Banchet, G. and Schaible, H. G., 2005. Calcitonin gene-related peptide enhances TTX-resistant sodium currents in cultured dorsal root ganglion neurons from adult rats. *Pain*, 116:194-204.
- Nielen, M. M., van Schaardenburg, D., Reesink, H. W., van de Stadt, R. J., van der Horst-Bruinsma, I. E., de Koning, M. H., Habibuw, M. R., Vandenbroucke, J. P. and Dijkmans, B. A., 2004. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*, 50:380-386.
- Obreja, O., Rathee, P. K., Lips, K. S., Distler, C. and Kress, M., 2002. IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. *Faseb J*, 16:1497-1503.
- Pohlers, D., Siegling, A., Buchner, E., Schmidt-Weber, C. B., Palombo-Kinne, E., Emmrich, F., Brauer, R. and Kinne, R. W., 2005. Expression of cytokine mRNA and protein in joints and lymphoid organs during the course of rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7: 445-R57.
- Poirot, O., Berta, T., Decosterd, I. and Kellenberger, S., 2006. Distinct ASIC currents are expressed in rat putative nociceptors and are modulated by nerve injury. *J Physiol*, 576:215-234.
- Pollock, J., McFarlane, S. M., Connell, M. C., Zehavi, U., Vandenabeele, P., MacEwan, D. J. and Scott, R. H., 2002. TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca<sup>2+</sup> mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. *Neuropharmacology*, 42:93-106.
- Raupach, B., Peuschel, S. K., Monack, D. M. and Zychlinsky, A., 2006. Caspase-1-mediated activation of interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-18 contributes to innate immune defenses against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect Immun*, 74:4922-4926.
- Rothe, J., Lesslauer, W., Lotscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Kontgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M. and Bluethmann, H., 1993. Mice Lacking the Tumor-Necrosis-Factor Receptor-1 Are Resistant to Tnf-Mediated Toxicity but Highly Susceptible to Infection by Listeria-Monocytogenes. *Nature*, 364:798-802.

- Roudier, J., 2000. Association of MHC and rheumatoid arthritis Association of RA with HLA-DR4: the role of repertoire selection. *Arthritis Res*, 2:217-220.
- Russell, F. A., Fernandes, E. S., Courade, J. P., Keeble, J. E. and Brain, S. D., 2009. Tumour necrosis factor alpha mediates transient receptor potential vanilloid 1-dependent bilateral thermal hyperalgesia with distinct peripheral roles of interleukin-1beta, protein kinase C and cyclooxygenase-2 signalling. *Pain*, 142:264-274.
- Safieh-Garabedian, B., Poole, S., Allchorne, A., Winter, J. and Woolf, C. J., 1995. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 115:1265-1275.
- Schäfers, M., Geis, C., Brors, D., Yaksh, T. L. and Sommer, C., 2002. Anterograde transport of tumor necrosis factor-alpha in the intact and injured rat sciatic nerve. *J Neurosci*, 22:536-545.
- Schäfers, M., Geis, C., Svensson, C. I., Luo, Z. D. and Sommer, C., 2003a. Selective increase of tumour necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. *Eur J Neurosci*, 17:791-804.
- Schäfers, M., Sorkin, L. S., Geis, C. and Shubayev, V. I., 2003b. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. *Neurosci Lett*, 347:179-182.
- Schäfers, M., Sorkin, L.S., Geis, C. and Shubayev, V.I., 2003c. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. *Neurosci Lett*, 347:179-182.
- Schaible, H. G., Ebersberger, A. and Segond von Banchet, G., 2002. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, New York, 343-354.
- Schaible, H. G. and Richter, F., 2004. Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg*, 389:237-243.
- Schaible, H.-G. und Schmidt, R. F., 2005. Nozizeption und Schmerz. Aus Schmidt, R. F., Lang, F. und Thews, G. (eds) Physiologie des Menschen. *Springer Medizin Verlag Heidelberg*, 29:317-333.
- Schweizer, A., Feige, U., Fontana, A., Muller, K. and Dinarello, C. A., 1988. Interleukin-1 enhances pain reflexes. Mediation through increased prostaglandin E2 levels. *Agents Actions*, 25:246-251.
- Segond von Banchet, G., Böttger, M. K., Fischer, N., Mieczyslaw, G. and Bräuer, R., 2009. Experimental arthritis causes tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent infiltration of macrophages into the dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. *Pain in press*, (doi:10.1016/j.pain.2009.06.002)
- Segond von Banchet, G., Pastor, A., Biskup, C., Schlegel, C., Benndorf, K. and Schaible, H. G., 2002. Localization of functional calcitonin gene-related peptide binding sites in a subpopulation of cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 110:131-145.

- Segond von Banchet, G. and Schaible, H. G., 1999. Localization of the neurokinin 1 receptor on a subset of substance P-positive and isolectin B4-negative dorsal root ganglion neurons of the rat. *Neurosci Lett*, 274:175-178.
- Segond von Banchet, G., Uhlig, B. and Schaible, H.-G., 2008. The cytokine IL1- $\beta$  and its receptor IL1-R1 in dorsal root ganglia (DRG) of the rat. *Acta Physiol*, 192, 663, OM 1-2-5
- Seitz, C., Muller, P., Krieg, R. C., Mannel, D. N. and Hehlhans, T., 2001. A novel p75TNF receptor isoform mediating NFkappa B activation. *J Biol Chem*, 276:19390-5.
- Shenker, N., Haigh, R., Roberts, E., Mapp, P., Harris, N. and Blake, D., 2003. A review of contralateral responses to a unilateral inflammatory lesion. *Rheumatology*, 42:1279-1286.
- Shubayev, V. I. and Myers, R. R., 2001. Axonal transport of TNF-alpha in painful neuropathy: distribution of ligand tracer and TNF receptors. *J Neuroimmunol*, 114:48-56.
- Smith, C. A., Farrah, T. and Goodwin, R. G., 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, 76:959-962.
- Sommer, C. and Kress, M., 2004. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*, 361:184-187.
- Sorkin, L. S. and Doom, C. M., 2000. Epineurial application of TNF elicits an acute mechanical hyperalgesia in the awake rat. *J Peripher Nerv Syst*, 5:96-100.
- Sorkin, L. S., Xiao, W. H., Wagner, R. and Myers, R. R., 1997. Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience*, 81:255-262.
- Spies, T., G. Blanck, M. Bresnahan, J. Sands and Strominger, J. L., 1989. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science*, 243:214-217.
- Stucky, C.L. and Lewin, G.R., 1999. Isolectin B-4-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *J Neurosci*, 19:6497-6505.
- Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K. and Imai, M. 2003. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem*, 278:22664-22668.
- Takada, H., Chen, N. J., Mirtsos, C., Suzuki, S., Suzuki, N., Wakeham, A., Mak, T. W. and Yeh, W. C., 2003. Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses. *Mol Cell Biol*, 23:4026-4033.
- Tartaglia, L. A., Weber, R. F., Figari, I. S., Reynolds, C., Palladino, M. A. and Goeddel, D. V., 1991. The 2 Different Receptors for Tumor-Necrosis-Factor Mediate Distinct Cellular-Responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:9292-9296.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3:1-12.

Villiger, P. M. and Bernhard, J., 2001. Rheumatoide Arthritis: Pathogenese und Pathologie *Schweiz Med Forum*, 8 179-183.

Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10:45-65.

Watkins, L. R., Wiertelak, E. P., Goehler, L. E., Smith, K. P., Martin, D. and Maier, S. F., 1994. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res*, 654:15-26.

Yu, L., Yang, F., Luo, H., Liu, F.Y., Han, J.S., Xing, G.G. and Wan, Y., 2008. The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant. *Mol Pain*, Published online 2008 December 4. doi: 10.1186/1744-8069-4-61.

## **6. Eigene Veröffentlichungen**

### **Wissenschaftliche Zeitschriften**

Böttger, M. K., Hensellek, S., Richter, F., Gajda, M., Stockigt, R., Segond von Banchet, G., Brauer, R. and Schaible, H. G., 2008. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum* 58:2368-78.

Hensellek, S., Brell, P., Schaible, H.-G., Brauer, R. and Segond von Banchet, G., 2007. The cytokine TNFalpha increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Mol Cell Neurosci*, 36:381-91.

### **Poster**

Hensellek, S., Segond von Banchet, G., Brauer, R. and Schaible, H. G., 2006. The proportion of TNFR1- and TNFR2-positive DRG neurones does not change in the course of antigen-induced-arthritis (AIA) in the knee joint of the rat. *Acta Physiol*, 186, Suppl. 1, PM02P-14

Hensellek, S., Segond von Banchet, G. and Schaible, H. G., 2007. Expression of TNFR1-receptor in dorsal root ganglia of the rat. *Acta Physiol*, 189, Suppl. 653, P20-L1-02

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät bekannt ist und dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe sowie alle benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in der Dissertation angegeben habe. Meine Betreuerin PD Dr. Gisela Segond von Banchet hat mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt.

Ich versichere, dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Ich habe diese Arbeit noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ich habe weder die gleiche Arbeit, noch wesentliche Teile der Arbeit bzw. eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 10.07.2009

Susanne Hensellek



## Selbständigkeitserklärung

---

### Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, 10.07.2009

Susanne Hensellek